

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Desarrollo farmacotécnico de nano- y microformulaciones de liberación controlada de anfotericina B para mejorar su biodisponibilidad y actividad terapéutica

Engineering of controlled release nano- and microformulations of amphotericin B to enhance bioavailability and efficacy

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel Fernández García

DIRECTOR

Dolores Remedios Serrano López
María de la Paloma Ballesteros Papantonakis
Francisco Bolás Fernández

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA GALÉNICA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA



TESIS DOCTORAL:

**Desarrollo farmacotécnico de nano- y microformulaciones
de liberación controlada de anfotericina B para mejorar su
biodisponibilidad y actividad terapéutica**

Engineering of controlled release nano- and microformulations of amphotericin B
to enhance bioavailability and efficacy

Raquel Fernández García

DIRECTORES:

Dra. Dolores Remedios Serrano López

Dra. María de la Paloma Ballesteros Papantonakis

Dr. Francisco Bolás Fernández

MADRID, 2020

“Investigar es ver lo que todo el mundo ya ha visto y pensar lo que nadie
ha pensado todavía”

“Research is to see what everybody has seen and think what nobody has
thought”

Albert Szent-Györgyi, Premio Nobel de Medicina 1937

Agradecimientos

Me gustaría dedicar esta Tesis Doctoral a todo el mundo que, de algún modo u otro, ha sido partícipe en este largo camino y sin los cuales no hubiera sido posible llegar a esta meta.

Quiero agradecer enormemente a mis directores de tesis, la Dra. Dolores Remedios Serrano López, la Dra. María de la Paloma Ballesteros Papantonakis y el Dr. Francisco Bolás Fernández, por toda la confianza que han depositado en mí desde el primer momento hasta el día de hoy y por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Me gustaría mostrar mi agradecimiento por su apoyo, así como por sus enseñanzas a lo largo de estos años, que me han hecho crecer tanto como profesional como humanamente. Además, quiero hacer este agradecimiento extensivo a todos los profesores y profesoras del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, que tanto apoyo me han mostrado durante todos estos años y me han hecho sentirme tan querida durante todo este tiempo.

Me gustaría agradecer su ayuda y apoyo a la Dra. Elena González Burgos y la Dra. Karla Slowing del Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica, así como a la Dra. Aikaterini Lalatsa, de la Universidad de Portsmouth, la Dra. María Auxiliadora Dea Ayuela, de la Universidad CEU Cardenal Herrera, y al Dr. Felipe Passero, de la Universidad Estadual Paulista, ya que su trabajo y conocimiento han sido importantísimos para culminar la realización de este trabajo.

Gracias a mis compis del departamento, que en los últimos años han pasado más tiempo conmigo que mi propia familia. Gracias por estar ahí y por los buenos momentos tanto dentro de la facultad como fuera, gracias también por estar en los momentos no tan buenos, que dentro de poco se convertirán en simples anécdotas. Gracias a Esther, Roberto, Carlos, Víctor, Rebeca, Raúl, Araceli, Mónica, Mario, José y Francis. Quiero hacer mención especial a Anais, que aunque ya hayas defendido y pasemos menos tiempo juntas, durante estos años has sido como una hermana mayor, y creo que esta opinión la compartirá conmigo más de un galénico, muchísimas gracias por todo. Además, quiero mostrar mi agradecimiento a todos aquellos compañeros que, aunque vinieron para un tiempo cortito, dejaron un recuerdo imborrable en nosotros, gracias especialmente a Adriana, Sejad, Myrto y Pachuli, pero, sobre todo, gracias a Manuela, por tu amistad, que no solo nos unió

en Madrid, sino que también se extendió a Norwich y pudimos compartir tantos momentos juntas.

Además, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Anne Marie Healy, del Trinity College Dublin, por haberme dado la oportunidad de trabajar con técnicas que hace tan solo unos años me parecía impensable que pudiese llegar a aprender. Gracias también a David, Kieran, Karl, Peter, Zelalem, Emer y Kit por haberme tratado tan bien durante mi estancia en Irlanda.

También agradezco a la Dra. Montserrat Gállego, de la Universidad de Barcelona, y a la Dra. Carmen Muñoz, del Hospital Sant Pau, por haberme acogido en su grupo de investigación y haberme enseñado tanto sobre leishmaniasis. Gracias a Anna, Cristina, Silvia, Eva, Alba y Rita.

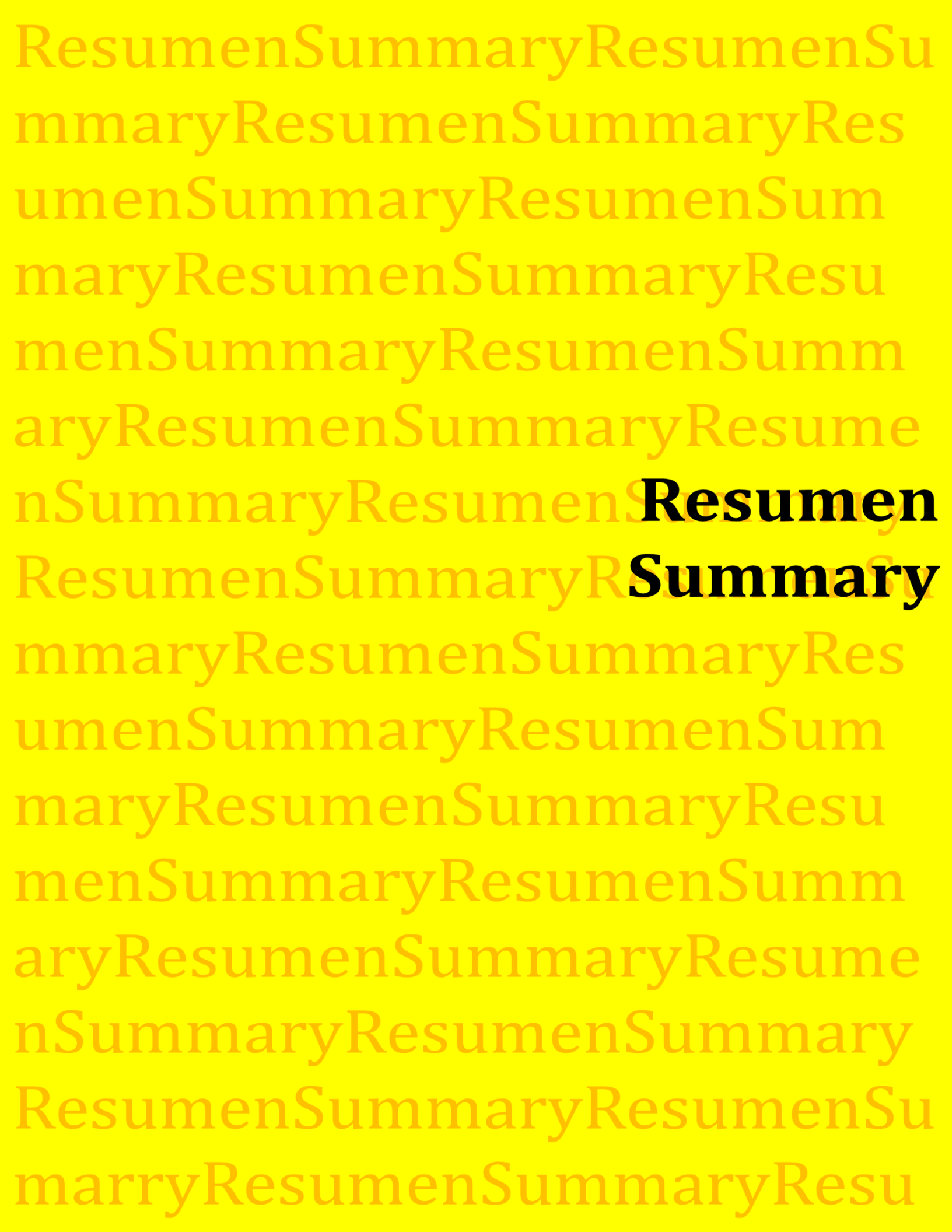
Quiero hacer extensivo mi agradecimiento al Dr. Yaroslav Khimyak, de la Universidad de East Anglia, por haberme descubierto el increíble mundo de la resonancia magnética nuclear. Doy las gracias también al Spanish team formado por Juan, Iñaki, Kika y Jesús, pero tampoco puedo olvidarme de los otros miembros del NMR team Matthew, Valeria, Serena, Trey, Tom y Alex. También quiero agradecer a Agne, Carolyn y Freddie por los buenos momentos que pasamos en Norwich y Londres.

Gracias a mis amigos, por haberme apoyado en cada momento y por haberme enseñado a ver la vida con ironía y con humor. Gracias a Miguel, Jorchcol, Porres, Clara, Luli, Isa, Jorge, Claudia y Alberto. En especial, quiero dar las gracias a Álex, por haberme comprendido y apoyado como nadie durante todos estos años y porque me ha encantado que hayas sido partícipe de este camino igual que yo he sido partícipe del tuyo.

Por último, agradezco enormemente a mi familia, en especial a mis padres. Quiero agradecerlos el haber estado siempre ahí, el haberme apoyado siempre, el no haberme cortado nunca las alas para llegar a ser quien soy hoy en día, pero sobre todo por enseñarme y transmitirme unos valores que son incluso más importante que toda la formación académica que he recibido. Esta tesis es tan vuestra como mía y sin vosotros no habría sido posible estar escribiendo estas palabras en este momento.

Índice

Resumen/Summary	3
Resumen.....	5
Summary	9
Introducción	13
Publicación 1: Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: the role of amphotericin B and drug targeting.....	19
Publicación 2: Transferosomes as nanocarriers for drugs across the skin: quality by design from lab to industrial scale.....	31
Publicación 3: Conventional and novel strategies in fixed-dose combination for antimicrobial therapy	49
Hipótesis y objetivos	75
Hipótesis.....	77
Objetivos.....	78
Resultados	81
Publicación 4: Understanding the self-assembly equilibrium process of amphotericin B and its impact on cell membrane interaction and efficacy-toxicity balance.....	83
Publicación 5: Enhanced transdermal delivery of amphotericin B for the treatment of cutaneous mycoses and leishmaniasis: transferosomes coupled with microneedles	139
Publicación 6: Can amphotericin B, itraconazole, miltefosine and allopurinol be co-delivered orally? Tailoring oral fixed-dose combination products for visceral leishmaniasis and systemic mycoses	171
Discusión final	233
Conclusiones	247
Conclusiones.....	249
Conclusions	250



Resumen

Summary

Resumen

Desarrollo farmacotécnico de nano- y microformulaciones de liberación controlada de anfotericina B para mejorar su biodisponibilidad y actividad terapéutica

Introducción

La elevada incidencia y prevalencia de las infecciones fúngicas y parasitarias supone un grave problema de salud pública a nivel global debido a la complejidad de dichos tratamientos, así como a la aparición de resistencias. Los tratamientos existentes actualmente engloban desde la administración parenteral de anfotericina B (AmB), con efectos nefrotóxicos y hemolíticos, hasta el uso oral de miltefosina, que puede resultar elevadamente tóxica a nivel gastrointestinal y además es teratogénica. AmB es el fármaco de referencia en la terapia antifúngica y antiparasitaria desde hace décadas, aunque afortunadamente el uso de la presentación Fungizona® ha sido desplazado por la formulación liposomal de AmB (AmBisome®) y otras presentaciones lipídicas, reduciendo su toxicidad. Además, la AmB presenta tres estados de agregación en solución y desarrolla su actividad a través de dos mecanismos de acción. La modulación del estado de agregación para desencadenar uno u otro mecanismo de acción es una estrategia prometedora en el tratamiento de estas infecciones.

Los mecanismos de acción que permiten la actividad antiinfecciosa de la AmB consisten en la ruptura de la membrana plasmática y la inducción del estrés oxidativo. La ruptura de la membrana plasmática se produce debido a la unión del fármaco al ergosterol presente en células fúngicas y parasitarias, que dan lugar a la formación de poros que liberan iones, produciendo una alteración electrolítica que finaliza con la muerte celular; mientras que la inducción del estrés oxidativo tiene lugar debido a un aumento de la concentración de radicales libres que provocan daños en la célula, conllevando la pérdida de la actividad metabólica de ésta.

Actualmente, sólo existen formulaciones de AmB de administración intravenosa disponibles en el mercado debido a la baja biodisponibilidad del fármaco a través de otras vías. Por ello, es necesario desarrollar formulaciones que permitan incrementar su biodisponibilidad. Así, la administración tópica u oral de formulaciones de AmB supone una alternativa terapéutica, incrementando la permeabilidad a través de la piel y la absorción a nivel gastrointestinal, respectivamente. Así, se permite una vectorización del fármaco hacia los tejidos diana. En los últimos años, se han desarrollado formulaciones similares a los liposomas para mejorar la permeabilidad transdérmica de fármacos, de la misma forma que la utilización de terapias combinadas para tratar infecciones. Estos sistemas permitirían, por lo tanto, un incremento de la biodisponibilidad de AmB a través de diferentes vías.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de nuevas formulaciones de AmB teniendo en cuenta su tamaño de partícula y estado de agregación. En la elaboración de estos sistemas, se utilizaron excipientes naturales y bioactivos para incrementar la tolerabilidad a estas

formulaciones. Las técnicas que se emplearon para la obtención de estas formulaciones fueron el método de hidratación en capa fina seguido de sonicación, así como granulación por vía húmeda seguida de recubrimiento en lecho fluido. Los objetivos específicos se describen a continuación:

1. Evaluación fisicoquímica y estudio *in vitro* de los estados de agregación de AmB. Para ello, se emplearon excipientes, como la γ -ciclodextrina o el desoxicolato sódico, y cambios en el pH para obtener los tres estados de agregación del fármaco.
2. Desarrollo y caracterización de transferosomas de AmB para administración transdérmica, combinando la utilización de microagujas.
3. Elaboración y caracterización de sistemas combinados de AmB, itraconazol, miltefosina y alopurinol en forma de pellets recubiertos para administración oral.

Resultados

La evaluación de los estados de agregación de AmB mostró que la AmB poliagregada era la menos eficaz, pero también la menos tóxica, siendo el estado de agregación con mejor balance eficacia/riesgo. Además, la AmB poliagregada fue la más cristalina incluso después de ser liofilizada y, por lo tanto, el estado de agregación menos soluble, con un mayor tamaño de partícula. Por otro lado, su difusión a través de membranas resultó ser menor que en los otros tres estados de agregación. La AmB poliagregada tuvo preferencia por el mecanismo de acción consistente en la unión al ergosterol, mientras que la AmB monomérica inducía principalmente estrés oxidativo. Así, se pudo conocer la importancia del tamaño de partícula y el estado de agregación en el desarrollo de nuevas formulaciones, así como su impacto en el balance beneficio/riesgo.

El uso de transferosomas redujo significativamente la toxicidad hemolítica de la AmB respecto al fármaco disuelto en DMSO, manteniendo su eficacia frente a *Candida* spp. (halo de inhibición >15 mm). Además, la formulación resultó muy activa frente a parásitos del género *Leishmania* spp. con una elevada selectividad, sin causar toxicidad frente a macrófagos de mamíferos. Por otro lado, los estudios de farmacocinética demostraron que la AmB encapsulada en transferosomas tenía una buena permeabilidad transdérmica que se veía mejorada con el uso combinado de microagujas, acumulándose una cantidad de fármaco en la piel superior a la CI_{50} frente a *Leishmania* spp.

Por otro lado, los pellets de AmB se caracterizaron por presentar una estructura cristalina en el núcleo con un recubrimiento amorfo para facilitar la disolución de los otros tres fármacos en medio acuoso. Además, el uso de recubrimiento permitió controlar la liberación de AmB hasta 24 horas. Los pellets recubiertos tuvieron una buena biodisponibilidad por vía oral alcanzándose altos valores en plasma y tejidos. La administración oral de estas formulaciones fue exitosa, reduciendo la carga parasitaria hasta un 85% y un 81.5% en hígado y bazo, respectivamente, en hámsters infectados con *L. infantum*.

Conclusiones

La solubilidad, biodisponibilidad y vectorización de la AmB se puede modular en función del tamaño de partícula, encapsulación y estado de agregación de las formulaciones. Esto permite optimizar cada formulación teniendo en cuenta la infección a tratar, el perfil farmacocinético de la formulación y la vía de administración a utilizar. Además, la combinación de AmB con excipientes bioactivos permitió la obtención de formulaciones tópicas y orales con una mejor biodisponibilidad que fue traducida en una mejora terapéutica. Estas formulaciones presentaron un balance eficacia/riesgo positivo y por lo tanto, son alternativas terapéuticas a los tratamientos actuales para infecciones fúngicas y parasitarias muy prometedoras.

Summary

Engineering of controlled release nano- and microformulations of amphotericin B to enhance bioavailability and efficacy

Introduction

An increase in the incidence and prevalence of fungal and parasitic infections has been reported, causing a global health problem due to the complexity of treatments, as well as the appearance of resistances. Current treatments involve parenteral administration of amphotericin B (AmB), with nephrotoxic and hemolytic effects, and also, the oral utilization of miltefosine, which can result highly toxic and teratogenic. AmB has been the reference drug in antifungal and anti-parasitic therapy for decades. The use of the Fungizone[®] has been downgraded by the liposomal formulation of AmB (AmBisome[®]) and other lipid formulations, decreasing its toxicity. Moreover, it is well-known that AmB presents three different aggregation states in solution and its activity takes place through two mechanisms of action. Modulating its aggregation state to trigger one or another mechanism of action is a promising strategy in the treatment of these infections.

The mechanisms of actions that enable the anti-infective activity of AmB consist on the disruption of plasma membrane and producing oxidative stress. Membrane disruption is produced by the binding of AmB to ergosterol in fungal and parasitic cells, triggering the formation of pores that generate the leakage of ions, resulting in an electrolytic disturbance which finalizes with cell death; while oxidative stress induction is produced due to an increase in the concentration of free radicals which cause cell damage, and hence a loss in the metabolic activity.

Nowadays, only intravenous formulations containing AmB are available in the market due to its low bioavailability through other pathways. Thus, there is an increased clinical need to engineer formulations that promote and enhance its bioavailability. Thereby, topical or oral administration of AmB formulations could be a therapeutic alternative to parenteral formulations. In the last few years, formulations based on liposomes have been developed to improve transdermal permeability of drugs, as well as the use of fixed-dose combinations to treat infections. The optimization of AmB topical and oral formulations would therefore open the therapeutic window for this drug and its clinical use in practice.

Aims

The main aim of this project was to engineer novel AmB formulations considering particle size and aggregation state. In the manufacturing of these systems, natural and bioactive excipients were selected to improve tolerance towards these formulations. The utilised techniques to obtain these formulations were film-thin hydration followed by sonication, as well as wet granulation followed by spray-coating. The specific aims of the project are described below:

1. Physicochemical characterization and manufacturing of the three AmB aggregation states, including several excipients such as γ -cyclodextrin and sodium deoxycholate, as well as a pH switch.
2. Development and characterization of AmB-transferosomes for transdermal delivery, combined with microneedles.
3. Engineering and characterization of fixed-dose combination products containing AmB, itraconazole, miltefosine and allopurinol, consisting of coated pellets with an AmB core coated by the other three drugs above mentioned.

Results

Evaluation of AmB aggregation states determined that poly-aggregated AmB was the least effective aggregation state, but also the least toxic. These results were correlated with the most favorable efficacy/toxicity balance compared to the other aggregation states. Apart from that, poly-aggregated AmB resulted in the most crystalline aggregation state after freeze-drying and, thus, the least soluble one, with the largest particle size. On the other hand, it was reported that, while the preferential mechanism of action of poly-aggregated AmB was the binding to the ergosterol located in the plasma membrane, the monomeric AmB had a greater tendency to induce oxidative stress. Thereby, the importance of particle size and aggregation state in the engineering of novel formulations was reported.

The encapsulation of AmB in transferosomes led to a significative decrease in hemolytic toxicity produced by AmB dissolved in DMSO, but maintaining its efficacy against of *Candida* spp. (inhibition halo >15 mm). Moreover, the formulation exhibited a higher efficacy against *Leishmania* spp. parasites resulting in a lower toxicity against murine macrophages and hence, a high selectivity index. Meanwhile, pharmacokinetic studies showed that AmB encapsulated in transferosomes had a great permeability across the skin resulting in drug accumulation in deeper regions of the skin above the IC₅₀ against *Leishmania* spp.

Besides, AmB pellets exhibited a crystalline core with amorphous coating layers. This formulation had an immediate release of AmB from uncoated pellets but a controlled release of AmB up to 24 hours. The oral bioavailability of AmB and the other drugs was significantly enhanced after oral administration resulting in a decrease in parasitic load by 85 % and 81.5 % in liver and spleen, respectively, in hamsters infected with *L. infantum*.

Conclusions

Solubility, bioavailability and targeting of AmB can be modulated according to particle size, encapsulation and aggregation state. All of the above allowed the optimization of different formulations targeted to antifungal and anti-parasitic infections, exhibiting a tuned pharmacokinetic profile for each administration route. Moreover, combining AmB with bioactive excipients or other active pharmaceutical ingredients enabled topical and oral bioavailability significantly. The AmB coated pellets and the AmB transferosomes are promising therapeutic

alternatives to the conventional antifungal and anti-leishmanial treatments with a very positive benefit/risk balance.



Introducción
Introduction

La introducción de esta tesis doctoral está presentada como un conjunto de tres publicaciones. A continuación, se han descrito a modo preliminar unas líneas presentando cada uno de los tres apartados que comprenden esta sección.

La incidencia de infecciones fúngicas y parasitarias causadas por especies de los géneros *Candida* spp. y *Leishmania* spp. ha presentado un incremento progresivo en los últimos años, principalmente en pacientes inmunodeprimidos y crónicos (1-3). Por este motivo, se ha generado un problema global, ya que la ausencia de tratamientos eficaces y la aparición de resistencias puede conllevar graves complicaciones e incluso la muerte. Los tratamientos antifúngicos utilizados en la actualidad engloban multitud de familias de fármacos, entre las que se encuentran las equinocandinas, los polienos, los azoles y los análogos de ácidos nucleicos, actuando en diferentes dianas farmacológicas (4). Sin embargo, el tratamiento de las infecciones parasitarias es mucho más complejo, ya que ninguno de los tratamientos disponibles en la actualidad es idóneo, debido a problemas de toxicidad, resistencias, alto coste, duración del tratamiento o inadecuada vía de administración. El tratamiento farmacológico de las leishmaniasis comprende la administración intravenosa, intramuscular o intralesional de antimoniales pentavalentes, como el estibogluconato de sodio o el antimoniato de meglumina, con una eficacia variable entre el 35 y el 95 % y con graves problemas de cardiotoxicidad, pancreatitis, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. Además, es común la utilización de miltefosina por vía oral, que presenta una eficacia entre el 94 y 97 %, pero también produce toxicidad a nivel gastrointestinal, renal y hepática, así como una elevada teratogenicidad, por lo que su uso en pacientes embarazadas debe restringirse. Por otro lado, también se ha empleado la administración intramuscular de paromomicina, pero su eficacia es muy variable (entre el 46 y 94 %) y presenta toxicidad renal, ótica y hepática (5). Debido a los inconvenientes que presentan los tratamientos antiparasitarios, la AmB ha pasado a ser el tratamiento de elección en este tipo de infecciones.

La AmB es un antifúngico macrólido de amplio espectro obtenido a partir de cepas de *Streptomyces nodosus*. Su utilización en clínica se remonta a la década de 1950 y, desde entonces, se ha convertido en el “gold standard” en terapia antifúngica (4). Además, este fármaco posee actividad antiparasitaria (6). Estructuralmente, la AmB consiste en un anillo formado por una cadena poliénica de carácter lipófilo y una cadena saturada que presenta grupos alcohol y tiene carácter hidrófilo, además de un grupo micosamina, con un peso molecular de 924 g/mol (7). Además, existe una variante estructural de este fármaco, conocido como anfotericina A (AmA) o nistatina, que presenta una insaturación menos en la cadena poliénica y un peso molecular de 925 g/mol, pero con una toxicidad mucho mayor (8) quedando relegada a un segundo plano en clínica.

Las propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y el perfil toxicológico de la AmB, así como una descripción de las formulaciones comercializadas en la actualidad y en desarrollo, aparecen descritas en la **publicación 1**.

Por otro lado, se ha demostrado que la encapsulación de agentes anti-infecciosos en nanosistemas de liberación de fármacos mejora la vectorización hacia los órganos diana donde se encuentran

acumulados los hongos o parásitos y, así, se pueden minimizar los efectos adversos (9). Estos nanosistemas pueden penetrar a través de membranas fisiológicas, como la piel, incrementando su eficacia (10-12). Los transferosomas son sistemas de liberación de fármacos de un tamaño nanométrico, muy similares estructuralmente a los liposomas, pero poseen cierta elasticidad y capacidad para deformarse (13), al contrario que la rigidez característica que presentan los liposomas. Los transferosomas contienen fosfolípidos en su composición, así como un surfactante que puede ser no iónico o derivado de sales biliares para desestabilizar las bicapas lipídicas que forman la vesícula e incrementar su elasticidad. De esta forma, estas vesículas se pueden deformar y penetrar a través de los espacios intercelulares del estrato córneo.

Una descripción sobre los transferosomas en fase de investigación preclínica, investigación clínica y comercializados, así como la aplicación de la calidad basada en el diseño (QbD) en el desarrollo farmacotécnico de transferosomas y las técnicas de fabricación a escala de laboratorio e industrial aparecen reflejadas en la **publicación 2**.

Por último, cabe destacar que la terapia combinada está en auge en el tratamiento de patologías infecciosas desde la implementación del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (14). La terapia combinada puede producir una acción sinérgica y un incremento en la eficacia de los agentes anti-infecciosos, permitiendo la administración de dosis más bajas y reduciendo la aparición de efectos adversos (15, 16). El uso de terapias combinadas no solo es aplicable a la terapia antimicrobiana, sino que es además útil en otras patologías, como la hipertensión o la terapia del dolor (17, 18), y abarca diferentes presentaciones farmacéuticas, ya sean comprimidos, granulados, inhaladores de polvo seco y, recientemente, las llamadas “polipíldoras” obtenidas por impresión 3D (19).

La **publicación 3** describe las terapias combinadas existentes en el mercado en la actualidad, tanto en patologías infecciosas como no infecciosas, dando especial relevancia al tratamiento frente al VIH y al virus de la hepatitis C. Además, aparecen reflejadas las técnicas de fabricación de estas formulaciones, así como los nuevos avances en terapia combinada anti-infecciosa.

REFERENCIAS

1. Fortun J. [Antifungal therapy update: new drugs and medical uses]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2011;29 Suppl 5:38-44.
2. van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(3):184-94.
3. van Griensven J, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet*. 2011;377(9764):443-4.
4. Fernandez-Garcia R, de Pablo E, Ballesteros MP, Serrano DR. Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting. *Int J Pharm*. 2017;525(1):139-48.
5. Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2012;2:11-9.
6. Cuddihy G, Wasan EK, Di Y, Wasan KM. The Development of Oral Amphotericin B to Treat Systemic Fungal and Parasitic Infections: Has the Myth Been Finally Realized? *Pharmaceutics*. 2019;11(3):99.
7. PubChem Database. Fungizone compound summary. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280965> (accessed on: 9th May 2019)
8. Semis R, Kagan S, Berdicevsky I, Polacheck I, Segal E. Mechanism of activity and toxicity of Nystatin-Intralipid. *Medical Mycology*. 2013;51(4):422-31.
9. Serrano DR, Lalatsa A, Dea-Ayuela MA, Bilbao-Ramos PE, Garrett NL, Moger J, et al. Oral particle uptake and organ targeting drives the activity of amphotericin B nanoparticles. *Mol Pharm*. 2015;12(2):420-31.
10. Rolon M, Serrano DR, Lalatsa A, de Pablo E, Torrado JJ, Ballesteros MP, et al. Engineering Oral and Parenteral Amorphous Amphotericin B Formulations against Experimental *Trypanosoma cruzi* Infections. *Mol Pharm*. 2017;14(4):1095-106.
11. Ruiz HK, Serrano DR, Dea-Ayuela MA, Bilbao-Ramos PE, Bolas-Fernandez F, Torrado JJ, et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania* spp. *Int J Pharm*. 2014;473(1-2):148-57.
12. Lalatsa A, Emeriewen K, Protopsalti V, Skelton G, Saleh GM. Developing transcutaneous nanoenabled anaesthetics for eyelid surgery. *The British journal of ophthalmology*. 2016;100(6):871-6.
13. Fernández-García R, Lalatsa A, Statts L, Bolás-Fernández F, Ballesteros MP, Serrano DR. Transferosomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *Int J Pharmaceut*. 2020;573:118817.
14. Bourliere M, Pietri O. Hepatitis C virus therapy: No one will be left behind. *Int J Antimicrob Ag*. 2019;53(6):755-60.
15. Schlosser R. Fixed-Dose and Fixed-Ratio Combination Therapies in Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes*. 2019;43(6):440-4.
16. Moriarty F, Bennett K, Fahey T. Fixed-dose combination antihypertensives and risk of medication errors. *Heart*. 2019;105(3):204-9.

17. Mazza A, Schiavon L, Zuin M, Lenti S, Ramazzina E, Rubello D, et al. Effects of the Antihypertensive Fixed-Dose Combinations on an Early Marker of Hypertensive Cardiac Damage in Subjects at Low Cardiovascular Risk. *American Journal of Hypertension*. 2016;29(8):969-75.
18. Pergolizzi JV, Jr., van de Laar M, Langford R, Mellinghoff H-U, Merchante IM, Nalamachu S, et al. Tramadol/paracetamol fixed-dose combination in the treatment of moderate to severe pain. *J Pain Res*. 2012;5:327-46.
19. Robles-Martinez P, Xu X, Trenfield SJ, Awad A, Goyanes A, Telford R, et al. 3D Printing of a Multi-Layered Polypill Containing Six Drugs Using a Novel Stereolithographic Method. *Pharmaceutics*. 2019;11(6).



ELSEVIER

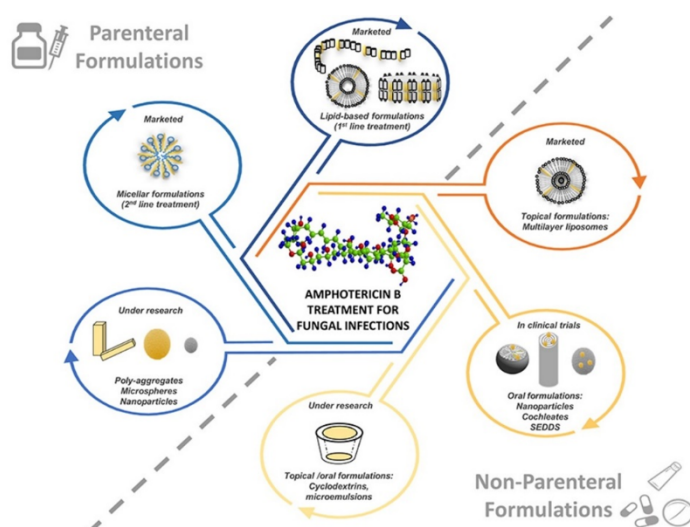
PUBLICACIÓN 1:

Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: the role of amphotericin B and drug targeting

Raquel Fernández-García, Esther de Pablo, M. Paloma Ballesteros, Dolores R. Serrano

Int J Pharm 525 (2017) 139-148 (IF: 3.862, 44/261, Pharmacology & Pharmacy, Q1)

Nº citas: 19 (Google Scholar Citations)





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting



Raquel Fernández-García^a, Esther de Pablo^a, María Paloma Ballesteros^{a,b}, Dolores R. Serrano^{a,b,*}

^a Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramo'n y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Instituto Universitario de Farmacia Industrial (IUPI), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2017

Received in revised form 4 April 2017

Accepted 6 April 2017

Available online 8 April 2017

Keywords:

Amphotericin B

AmBisome®

Drug delivery

Candida spp

Nanoparticles

Poly-aggregates

Nephrotoxicity

ABSTRACT

Recently an increase in both the prevalence and incidence of invasive fungal infections have been reported. The number of fungal species that can cause systemic mycoses are higher and current antifungal therapies are still far from ideal. The emergence of antifungal resistances has a major clinical impact when using azoles and echinocandins leading to possible treatment failure and ultimately putting the patient's life at risk. Amphotericin B can play a key role in treating severe invasive mycoses as the incidence of antifungal resistance is very low combined with a high efficacy against a wide range of fungi. However, the use of this drug is limited due to its high toxicity and the infusion-related side effects often necessitating patient hospitalisation. New medicines based on lipid-based systems have been commercialised in the last decade, these treatments are able to reduce the toxicity of the drug but intravenous administration is still required. An oral or topically self-administered amphotericin B formulation can overcome these challenges, however such a product is not yet available. Several drug delivery systems such as cochleates, nanoparticulate and self-emulsifying systems are under development in order to enhance the solubility of the drug in aqueous media and promote oral absorption and cutaneous permeation across the skin. In this review, the type of drug delivery system and the effect of particle size on efficacy, toxicity and biodistribution will be discussed.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the last decade, the treatment of systemic fungal infections has been significantly improved; however, the current antifungal therapies are still far from ideal due to the limited arsenal of clinically available drugs, the development of resistances and also the challenges of adequate and early diagnosis (Roemer and Krysan, 2014; Zhai and Lin, 2011). Recently an increase in both the prevalence and incidence of invasive fungal infections have been reported. Moreover, the number of fungal species that cause systemic mycoses is higher. Several factors have triggered this serious public health such as: (i) the increase of immunosuppressed patients due to HIV, cancer therapies and organ transplants; (ii) the increase in the use of broad-spectrum antibiotics for a long

time leading to resistances and (iii) the increase of catheter-related bloodstream infections (Florez, 1998; Yang et al., 2016).

The most common species that cause fungal systemic infections are: *Candida albicans* (*C. albicans*), *Aspergillus fumigatus* and *Cryptococcus neoformans*, as well as other opportunist fungi such as *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* and *Fusarium*. In addition, new pathogenic fungi resistant to the current antifungal therapy have appeared, such as *Acremonium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* and *Trichoderma* (Yang et al., 2016). Among hospital-acquired infections, *Candida* accounts for 50% of the mycosis followed by *Aspergillus* (6.8%), *Cryptococcus* (4.5%), molds (4.3%), zygomycetes (1.4%) and other fungi (33%) (Fig. 1) (Peman, 2008; Roemer and Krysan, 2014).

The number of agents available to treat invasive fungal infections has increased by 30% since the turn of the millennium (Dodds et al., 2006). Nevertheless, the number of therapeutic drugs available for the treatment of invasive fungal infections is quite limited when compared to those available to treat bacterial infections (Roemer and Krysan, 2014). Amphotericin B is one of the oldest antifungal drugs that in spite of its high toxicity, still

* Corresponding author at: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramo'n y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: dserran@ucm.es (D.R. Serrano).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.013>

0378-5173/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



ELSEVIER

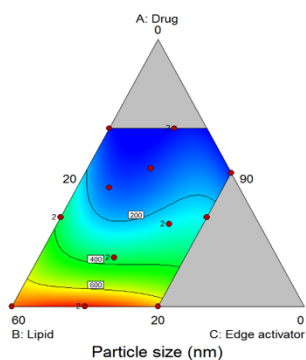
PUBLICACIÓN 2:

Transferosomes as nanocarriers for drugs across the skin: quality by design from lab to industrial scale

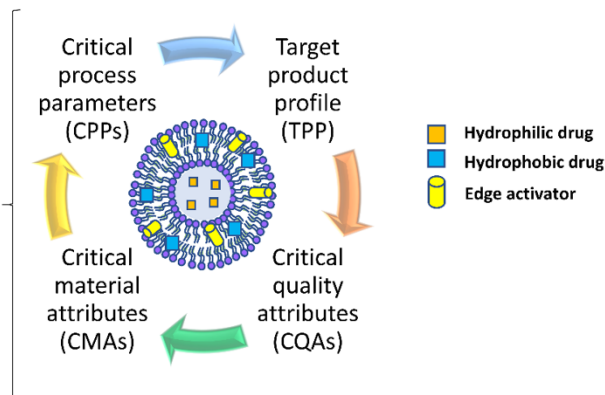
Raquel Fernández-García, Aikaterini Lalatsa, Larry Statts, Francisco Bolás-Fernández, M.
Paloma Ballesteros, Dolores R. Serrano

Int J Pharm 573 (2020) 118817 (IF: 4.213, 44/267, Pharmacology & Pharmacy, Q1)

Nº citas: 1 (Google Scholar Citations)



Design
of
experiments





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Review

Transfersomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale

Raquel Fernández-García^a, Aikaterini Lalatsa^b, Larry Statts^b, Francisco Bolás-Fernández^c, M. Paloma Ballesteros^{a,d,*}, Dolores R. Serrano^{a,d,*}^a Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid, Spain^b School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth, St. Michael's Building, White Swan Road, Portsmouth PO1 2DT, UK^c Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid, Spain^d Instituto Universitario de Farmacia Industrial, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Transfersomes
 Ultradeformable vesicles
 Transdermal administration
 Natural products
 Edge activator
 Quality by design (QbD)

ABSTRACT

Transfersomes, also known as transfersomes, are ultradeformable vesicles for transdermal applications consisting of a lipid bilayer with phospholipids and an edge activator and an ethanol/aqueous core. Depending on the lipophilicity of the active substance, it can be encapsulated within the core or amongst the lipid bilayer. Compared to liposomes, transfersomes are able to reach intact deeper regions of the skin after topical administration delivering higher concentrations of active substances making them a successful drug delivery carrier for transdermal applications. Most transfersomes contain phosphatidylcholine (C18) as it is the most abundant lipid component of the cell membrane, and hence, it is highly tolerated for the skin, decreasing the risk of undesirable effects, such as hypersensitive reactions. The most common edge activators are surfactants such as sodium deoxycholate, Tween® 80 and Span® 80. Their chain length is optimal for intercalation within the C18 phospholipid bilayer. A wide variety of drugs has been successfully encapsulated within transfersomes such as phytochemicals like sinomenine or apigenin for rheumatoid arthritis and leukaemia respectively, small hydrophobic drugs but also macromolecules like insulin. The main factors to develop optimal transfersosomal formulations (with high drug loading and nanometric size) are the optimal ratio between the main components as well as the critical process parameters for their manufacture. Application of quality by design (QbD), specifically design of experiments (DoE), is crucial to understand the interplay among all these factors not only during the preparation at lab scale but also in the scale-up process. Clinical trials of a licensed topical ketoprofen transfersosomal gel have shown promising results in the alleviation of symptoms in osteoarthritis with non-severe skin and subcutaneous tissue disorders. However, the product was withdrawn from the market which probably was related to the higher cost of the medicine linked to the expensive manufacturing process required in the production of transfersomes compared to other conventional gel formulations. This example brings out the need for a careful formulation design to exploit the best properties of this drug delivery system as well as the development of manufacturing processes easily scalable at industrial level.

1. Skin as a barrier for topical and transdermal therapies

Skin is the largest interface between the human body and the external environment (Prausnitz et al., 2012). Being the body's largest organ (Hadgraft and Lane, 2011), skin maintains body's homeostasis by regulating the entrance and clearance of different substances, preventing excessive water loss and maintaining body temperature. However, exchange of substances across the skin is very limited as its

primary function is protection compared to the gastrointestinal tract or the lung epithelial which are designed for compound exchange (Prausnitz et al., 2012).

Skin is composed of three main layers: the epidermis (the outer layer), the dermis (the middle layer containing sensory receptors, sweat glands and various connective fibers) and the hypodermis (subcutaneous layer which contains adipose tissue and anchors the other two outer layers of the skin for support) (Hadgraft and Lane, 2011). The

* Corresponding author at: Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: drserran@ucm.es (D.R. Serrano).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118817>

Received 17 July 2019; Received in revised form 18 October 2019; Accepted 19 October 2019

Available online 31 October 2019

0378-5173/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



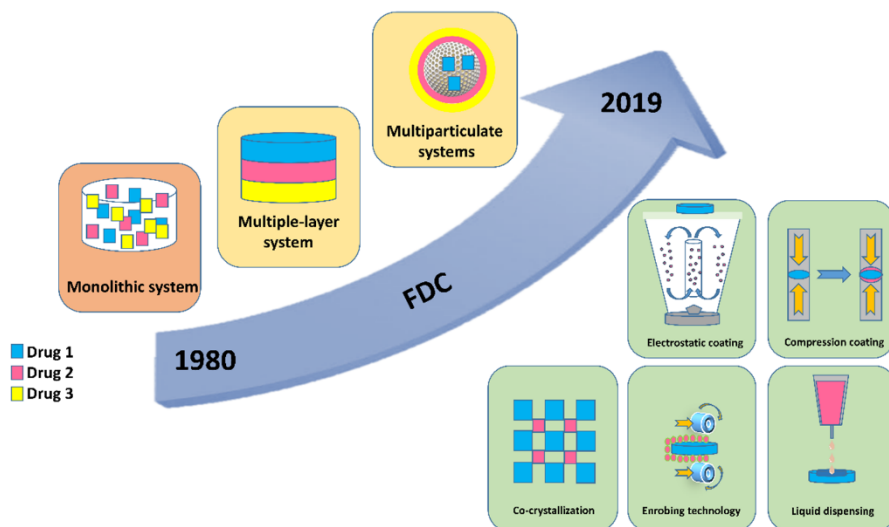
ELSEVIER

PUBLICACIÓN 3:

Conventional and novel strategies in fixed-dose combination for antimicrobial therapy

Raquel Fernández-García, Francisco Bolás-Fernández, M. Paloma Ballesteros, Dolores R. Serrano

Pendiente de publicación. Enviado a: Eur J Pharm Sci (IF: 3.532, 71/267, Pharmacology & Pharmacy, Q2)



ABSTRACT

Antimicrobial therapy has traditionally been challenging due to the lack of efficacy, the complex cocktail of drugs and the appearance of resistances. However, formulation scientists, as well as pharmaceutical industry, have overcome this issue by using different technological approaches. Fixed-dose combination medicines consist on the combination of at least two different active pharmaceutical ingredients (APIs) with similar or different mechanism of action to improve their effectiveness and, in some cases, with a synergistic effect. The manufacturing of a single pill that combines different APIs with several release profile kinetics has been a great achievement to improve patient compliance. Physicochemical drug interactions have been sorted out by separating the drugs in different layers or isolated compartments. However, pharmacodynamic interactions remain still a big challenge, as well as the difficulty to adjust the drug dose to each individual patient. Industrial manufacturing of FDC for antimicrobial drugs is challenging bearing in mind the wide physicochemical portfolio of the drugs which can limit the temperature used during hot melt extrusion (for thermolabile drugs) or the use of certain solvents utilised for spray drying or spray coating due to drug instability. Novel approaches for the fabrication of FDCs, such as 3D-printing, are under development and could have a high impact in the fabrication of FDC medicines in hospital and community pharmacies, making feasible personalised therapies and promoting patient compliance. In this review, the current manufacturing techniques utilised in the fabrication of antimicrobial FDCs as well as novel technological approaches will be discussed in detail.

KEYWORDS

Fixed-dose combination, HIV, hepatitis C virus, spray coating, hot melt extrusion, 3D-printing

1. INTRODUCTION

Fixed-dose combination (FDC) is the term used in pharmaceutical technology to describe the combination of drugs, which includes at least two active pharmaceutical ingredients (APIs) combined in a single dosage form, which is manufactured and distributed in a fixed-dose (Collier, 2012; Gautam and Saha, 2008). FDC is well-known in antimicrobial therapy as it has been widely used in highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV) and, in the last few years, direct-acting antiviral agents (DAAs) in cases of hepatitis C virus (HCV) (Bourliere and Pietri, 2019). However, FDC has been also developed for the treatment of other pathologies, such as bacterial infections (amoxicillin/clavulanic acid), hypertension (amlodipine/ramipril), oral contraception (ethinylestradiol/gestodene) or in cases of severe pain (tramadol/paracetamol), as well as for poly-medicated patients suffering from metabolic syndrome including hypertension and hypercholesterolemia (amlodipine/atorvastatin) (AEMPS, 2019a).

FDCs are especially attractive for poly-medicated patients bearing in mind that they facilitate adherence to medication and reduce pill burden (Farrell et al., 2013; Lung, 2019). FDCs can also modify the in vivo behavior of drugs compared to monotherapy due to changes in the pharmacokinetic and pharmacodynamic profile for example, producing a synergistic activity between the APIs contained within the FDC (Moriarty et al., 2019; Schlosser, 2019). From an economical point of view, FDC can reduce the cost of manufacturing, packaging and distribution and, overall, decrease the medicine cost (Sadia et al., 2018). Additionally, the synergistic activity in vivo allows the possibility to administer lower drug doses what reduces the risk of appearance of adverse effects (Moriarty et al., 2019). Nevertheless, FDCs also have disadvantages, including the fact that some patients may receive an excess or deficiency of any of the APIs included in the dosage form, being unsuitable for them (Khouri, 2008) and the fact that it makes more difficult to identify an adverse effect in case it happens. FDCs can also lead to medication errors due to mistakes between drugs and brand names (Aronson, 2004).

Depo-Testadiol[®], a medicine containing estradiol and testosterone for intramuscular administration, was the first approved FDC product in 1980 (FDA, 1980). Approval of medicines containing two or more drugs has significantly increased since then (Hao et al., 2016). Actually, more than 10 solid dosage forms containing different combinations of antiretroviral drugs within the same pill have been approved by the Food & Drug Administration (FDA) in the last 5 years for HAART. FDC is a trending topic in formulation science even though, it is not a recent approach and the extra challenge during formulation and manufacturing.

2. FDC MEDICINES

FDCs have been used in almost all type of diseases. The use of FDC is widely exploited, for example, in anti-flu preparations, dry-powder inhalers (DPI) in patients with asthma, oral contraception, hypertension and analgesia (Zaldiar[®] containing of 37.5 mg of tramadol with 325 mg of paracetamol) (AEMPS, 2017e). Table 1 illustrates several examples of FDC products. As it

can be appreciated, anti-flu preparations usually combine an analgesic or anti-inflammatory drug to reduce fever and pain, as well as antihistamines, cough suppressants or decongestants to decrease the typical symptoms of flu (AEMPS, 2017a, 2018d, 2019b). The total amount of APIs within the FDC can be greater than 1000 mg making effervescent tablets and granules for oral suspension the preferable dosage forms. FDC products to treat respiratory affections include corticosteroids and β_2 -agonists because it has been demonstrated a synergistic action between both type of drugs. β_2 -agonists induce a nuclear translocation of corticosteroids receptors, as well as an inhibition of the nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), promoting the effect of corticosteroids (AEMPS, 2018a, i, 2019d; Hancox, 2006). Oral contraception is also a good example of FDC therapy, considering that all monthly treatments of oral contraception should include an estrogen derivative and a progestin derivative (AEMPS, 2018f, k, l), with the aim of preventing ovulation by suppressing the release of gonadotropins and inhibiting follicular development (Mazori, 2019); while in emergency contraception only a high dose of progestin is administered (AEMPS, 2014a, 2018g). Regarding hypertension, different combinations of FDC are commercialised, including: i) an angiotensin II agonist receptor with a diuretic, a calcium channel blocker with an angiotensin-converter enzyme inhibitor and ii) an angiotensin II agonist receptor with a calcium channel blocker and a diuretic (AEMPS, 2008a, 2018c, 2019e). Most of them contain hydrochlorothiazide as diuretic as it produces a synergistic effect at different levels depending on the mechanism of action of the other antihypertensive molecules within the FDC product. FDCs are also highly used in the treatment of severe pain which is based on the combination of an analgesic drug with an opioid with the aim of obtaining a pain-reliever effect with a rapid action, longer duration and high tolerance (AEMPS, 2015a, 2017e; Dhillon, 2010). The combination of an opioid with an antagonist of the opioid receptors is also utilised to decrease the risk of opioid-induced constipation, which affects between 40 to 60 % of patients (AEMPS, 2018j; Sizar and Gupta, 2019).

Table 1: Examples of commercially available FDC approved by the Spanish Medicine Regulatory Authority (AEMPS). Key: DPI, dry powder inhaler.

Therapeutic use	Brand name	Composition (mg)	Effect	Dosage form	References
Anti-flu preparations	Frenadol®	Paracetamol (650)	Analgesic	Granules for oral suspension	(AEMPS, 2019b)
		Chlorphenamine (2.8)	Antihistamine		
		Dextromethorphan (20)	Cough suppressant		
		Caffeine (30)	Central nervous system stimulant and adjuvant of analgesia		
		Ascorbic acid (250)	Vitamin supplement		
	Couldina®	Acetylsalicylic acid (500)	Analgesic and anti-inflammatory	Effervescent tablets	(AEMPS, 2018d)

		Chlorphenamine (1.41)	Antihistamine		
		Phenylephrine (6.16)	Decongestant		
	Ilvico®	Paracetamol (325)	Analgesic	Tablets	(AEMPS, 2017a)
		Caffeine (30)	Central nervous system stimulant and adjuvant of analgesia		
		Brompheniramine (3)	Antihistamine		
Respiratory affections	Symbicort®	Budesonide (0.32)	Corticosteroid	DPI (Turbuhaler®)	(AEMPS, 2018i)
		Formoterol (0.009)	β ₂ -agonist		
	Rilast®	Budesonide (0.16)	Corticosteroid	DPI (Turbuhaler®)	(AEMPS, 2019d)
		Formoterol (0.0045)	β ₂ -agonist		
	Anasma®	Salmeterol (0.047)	β ₂ -agonist	DPI (Accuhaler®)	(AEMPS, 2018a)
		Fluticasone (0.092)	Corticosteroid		
Oral contraception	Yasmin®	Drospirenone (3)	Progestin	Tablets	(AEMPS, 2018k)
		Ethinylestradiol (0.03)	Estrogen		
	Yaz®	Drospirenone (3)	Progestin	Tablets	(AEMPS, 2018l)
		Ethinylestradiol (0.02)	Estrogen		
	Meliane®	Gestodene (0.075)	Progestin	Tablets	(AEMPS, 2018f)
		Ethinylestradiol (0.02)	Estrogen		
Hypertension	Coaprovel®	Irbesartan (150)	Angiotensin II receptor antagonist	Tablets	(AEMPS, 2008a)
		Hydrochlorothiazide (12.5)	Diuretic		
	Tarka®	Verapamil (180)	Calcium channel blocker	Capsules	(AEMPS, 2019e)
		Trandolapril (2)	Angiotensin-converting-enzyme inhibitor		
	Capenon®	Olmesartan (20)	Angiotensin II receptor antagonist	Tablets	(AEMPS, 2018c)
		Amlodipine (5)	Calcium channel blocker		
		Hydrochlorothiazide (12.5)	Diuretic		
Severe pain	Zaldiar®	Tramadol (37.5)	Opioid	Tablets	(AEMPS, 2017e)
		Paracetamol (325)	Analgesic		
	Dolocatil codeine®	Paracetamol (325)	Analgesic	Tablets	(AEMPS, 2015a)
		Codeine (11.1)	Opioid		
	Targin®	Oxycodone (4.5)	Opioid	Tablets	

		Naloxone (2.25)	Opioid receptor antagonist		(AEMPS, 2018j)
--	--	-----------------	----------------------------------	--	-------------------

3. FDC IN INFECTIOUS DISEASES

Apart from the pathologies mentioned in the previous section, FDCs are widely used in the treatment of infectious diseases due to their high prevalence and an increase in the appearance of resistances. In last decades, a few infections have been already treated combining several antibiotics, for example, the infection caused by *Helicobacter pylori* by means of amoxicillin, clarithromycin and a proton pump inhibitor (Mirbagheri et al., 2006); the successful treatment of this infection is limited to a cocktail of solid dosage forms, which hampers patient compliance and increase the risk of adverse effects. Several antibiotics are also commercialised as a single dosage form, combining amoxicillin with clavulanic acid or trimethoprim with sulfamethoxazole (cotrimoxazole) (AEMPS, 2017b). However, no FDCs are currently in the market for the treatment of *Mycobacterium tuberculosis* whose treatment requires the intake of 3-4 tablets daily (rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, ethambutol). Although, there are under clinical trials several FDC medicines (RHZE) (Blomberg et al., 2001; Salazar-Austin et al., 2015; Teixeira et al., 2018). Combination of antimicrobials with antiviral activity is widely used in HIV and HCV, combining APIs which act on different targets at different stages of the life-cycle of the viruses (Moore and Chaisson, 1999).

3.1 FDCs and HIV

Antiretroviral treatment against HIV was first established in 1987; but the combination of antimicrobials to control the infection was initialised by Merck KGaA and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases in 1995, by proposing the combination of a protease inhibitor and two nucleoside analogs (Gulick et al., 1997). The administration of more than one drug to control the HIV infection received the name of HAART. HAART changed drastically in 1997, with the approval by the FDA of the combination of lamivudine and zidovudine (nucleoside analogs) in the same pharmaceutical dosage form, receiving the name of Combivir® (AEMPS, 2008b) and was the first authorised FDC product used in the control of the HIV infection.

Antiretroviral therapy usually includes molecules with different mechanism of action. Table 2 shows FDC products utilised in HIV infections approved by the FDA. There are six different classes of drugs depending on their mechanism of action for HIV: entry inhibitors (EI), nucleoside/nucleotide reverse-transcriptase inhibitors (NRTI), non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NNRTI), integrase inhibitors (II), protease inhibitors (PI) and booster drugs (BD). EIs block the entrance of HIV inside human cells by preventing the interaction of the virus with the CD4 receptors and CCR5 or CXCR4 co-receptors of white cells. NRTIs inhibit the transformation of viral RNA into DNA, by introducing non-functional nucleosides or nucleotides in the DNA, blocking the transcription process; NNRTIs bind to the reverse-transcriptase, inhibiting its activity and hence blocking the replication of the virus. Finally, IIs and PIs block the

incorporation of viral DNA into the host chromosome and the breakage of polypeptides required for the assembly of mature virus, respectively. Although the virus is still able to replicate when PI are administered, immature virions unable to infect other cells are formed (Aidsmap, 2019). BD are able to inhibit the protease enzyme, but their function is to inhibit the CYP3A enzyme that metabolizes the PIs and hence, maintain greater plasma concentration for longer periods of time.

Table 2: Anti-HIV FDC products approved by the FDA. Key: NRTI (nucleoside/nucleotide reverse-transcriptase inhibitors), PI (protease inhibitors), BD (booster drugs), NNRTI (non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors), II (integrase inhibitors).

Brand name	Composition (mg)	Mechanism of action	FDA approval year	References
Combivir®	Lamivudine (150)	NRTI	1997	(AEMPS, 2008b)
	Zidovudine (300)	NRTI		
Kaletra® (Several presentations)	Lopinavir (80, 100 or 200)	PI	2000	(AEMPS, 2011a)
	Ritonavir (20, 25 or 50)	BD		
Trizivir®	Abacavir (300)	NRTI	2000	(AEMPS, 2011b)
	Lamivudine (150)	NRTI		
	Zidovudine (300)	NRTI		
Kivexa®	Abacavir (600)	NRTI	2004	(AEMPS, 2014c)
	Lamivudine (300)	NRTI		
Truvada®	Emtricitabine (245)	NRTI	2004	(AEMPS, 2010)
	Tenofovir (200)	NRTI		
Atripla®	Emtricitabine (245)	NRTI	2006	(AEMPS, 2012)
	Tenofovir (200)	NRTI		
	Efavirenz (600)	NNRTI		
Eviplera®	Emtricitabine (200)	NRTI	2011	(AEMPS, 2016c)
	Tenofovir (245)	NRTI		
	Rilpivirine (25)	NNRTI		
Stribild®	Emtricitabine (200)	NRTI	2012	(AEMPS, 2018h)
	Tenofovir (245)	NRTI		
	Elvitegravir (150)	II		
	Cobicistat (150)	BD		
Triumeq®	Abacavir (600)	NRTI	2014	(AEMPS, 2019f)
	Lamivudine (300)	NRTI		
	Dolutegravir (50)	II		
Evotaz®	Atazanavir (300)	PI	2015	(AEMPS, 2015b)
	Cobicistat (150)	BD		
Rezolsta®	Darunavir (800)	PI	2015	(AEMPS, 2014d)
	Cobicistat (150)	BD		
Dutrebis®	Lamivudine (150)	NRTI	2015	(FDA, 2015)
	Raltegravir (300)	II		
Genvoya®	Emtricitabine (200)	NRTI	2015	(AEMPS, 2015c)
	Tenofovir (10)	NRTI		
	Elvitegravir (150)	II		

	Cobicistat (150)	BD		
Odefsey®	Emtricitabine (200)	NRTI	2015	(AEMPS, 2016d)
	Tenofovir (25)	NRTI		
	Rilpivirine (25)	NNRTI		
Descovy® (Several presentations)	Emtricitabine (200)	NRTI	2016	(AEMPS, 2016a)
	Tenofovir (10 or 20)	NRTI		
Juluca®	Rilpivirine (25)	NNRTI	2017	(AEMPS, 2018e)
	Dolutegravir (50)	II		
Symfi®	Lamivudine (300)	NRTI	2018	(FDA, 2018b)
	Tenofovir (300)	NRTI		
	Efavirenz (600)	NNRTI		
Biktarvy®	Emtricitabine (200)	NRTI	2018	(AEMPS, 2018b)
	Tenofovir (25)	NRTI		
	Bictegravir (50)	II		
Cimduo®	Lamivudine (300)	NRTI	2018	(FDA, 2018a)
	Tenofovir (300)	NRTI		
Symtuza®	Emtricitabine (200)	NRTI	2018	(AEMPS, 2017c)
	Tenofovir (10)	NRTI		
	Darunavir (800)	PI		
	Cobicistat (150)	BD		
Delstrigo®	Lamivudine (300)	NRTI	2018	(FDA, 2018c)
	Tenofovir (300)	NRTI		
	Doravirine (100)	NNRTI		
Dovato®	Lamivudine (300)	NRTI	2019	(FDA, 2019)
	Dolutegravir (50)	II		

EI (maraviroc, enfuvirtide and idalizumab) are still not available in the market in FDC products. The single-tablet regimen of HAART lacks the incorporation of EI (Biswas et al., 2007). It is worthy highlighting that PIs are highly recommended to be co-administered with a BD to avoid the replication of the virus, even if inhibition of the protease results in immature virions. Atripla® is well-known and commonly used as a reference FDC due to the fact that it was the first FDC medicine which combined antiretroviral drugs with different targets and different release profiles within the same dosage form (Siyawamwaya et al., 2019). Patents for some of the FDC products has already expired and generic products are coming to the market making the HAART therapy more affordable.

3.2 FDC and HCV

HCV was traditionally treated by administering pegylated interferon (PEG-INF- α 2a or PEG-INF- α 2b) combined with ribavirin and, sometimes, a PI (boceprevir or telaprevir) (Rong and Perelson, 2010). Ribavirin administered as monotherapy demonstrated no effect in controlling the HCV infection; however, in combination with PEG-IFN, exhibited a great improvement in the therapy outcome. PIs were useful in anti-HCV therapy due to the similarities of the HIV virus, and their effect was determined to be additive to the effect of PEG-IFN (Rong and Perelson, 2010).

Unfortunately, the treatment of the HCV was traumatic and painful, due to the high amount of adverse effects that PEG-INF and ribavirin exhibited, including headache, pyrexia, myalgia, arthralgia, nausea and fatigue (Manns et al., 2006).

In 2013, the treatment of HCV was notably upgraded by the approval of several antiviral FDC products. The FDC products that combined antiviral drugs to control the HCV infection received the name of DAAs (Bourliere and Pietri, 2019). Antiviral treatment against HCV is currently based in the inhibition of the activity of three non-structural proteins: NS3/4, NS5A and NS5B. NS3/4 is a viral protease enzyme that also possesses helicase activity and participates in the replication process; NS5A does not have any known enzymatic activity and participates in the replication of the virus and its assembly due to its ability to bind to the RNA, while NS5B is a polymerase-RNA dependent. The name of the antiviral drug is always related to its target: NS3/4 inhibitors possess the suffix *-previr*, NS5A-targeted drugs *-asvir* and NS5B inhibitors *-buvir*. The regimen in antiviral therapy against HCV is consisting of: i) the combination of sofosbuvir (NS5B inhibitor) with a NS5A inhibitor, ii) the combination of a NS3/4A protease inhibitor with ritonavir, iii) a NS5A inhibitor and a non-nucleoside NS5B inhibitor and iv) the combination of a NS3/4A protease inhibitor with a NS5A inhibitor (Bourliere and Pietri, 2019). FDC was later introduced in anti-HCV therapy and was based on the combination of sofosbuvir and ledipasvir (NS5B and NS5A inhibitors, respectively, known as Harvoni®) (AEMPS, 2014b; Afdhal et al., 2014). Fortunately, the FDA has recently approved different FDC products to control the HCV infection, increasing the opportunities of treatment with a higher efficacy and shorter course duration, but at higher cost (Table 3).

Table 3: Recommended regimens for the management of chronic HCV infection. Adapted from: (Marks and Naggie, 2019).

Brand name	Composition (mg)	Target	Weeks of therapy	Cost (\$)	References
Zepatier®	Elbasvir (50)	NS5A	12	54,600	(AEMPS, 2016e)
	Grazoprevir (100)	NS3/4			
Marivet®	Glecaprevir (100)	NS3/4	8 or 12 (if cirrhosis)	26,400 or 39,600 (if cirrhosis)	(AEMPS, 2019c)
	Pibrentasvir (40)	NS5A			
Harvoni®	Ledipasvir (90)	NS5A	12	94,500	(AEMPS, 2014b)
	Sofosbuvir (400)	NS5B			
Epclusa®	Sofosbuvir (400)	NS5B	12	74,760	(AEMPS, 2016b)
	Velpastasvir (100)	NS5A			
Vosevi®	Sofosbuvir (400)	NS5B	12	74,760	(AEMPS, 2017d)
	Velpastasvir (100)	NS5A			
	Voxilaprevir (100)	NS3/A			

In contrast with anti-HIV therapy, the use of FDC to control HCV infection always combines drugs with different targets in the life-cycle of the virus. Another difference is that all targets are proteins, while membrane receptors or viral DNA are also targeted in HAART. Apart from that, the high cost of the treatment can be disadvantageous for patients, mainly in undeveloped countries.

4. INDUSTRIAL MANUFACTURING OF FDC MEDICINES

The versatility of FDCs allows the development of dosage forms using different strategies which contain drugs with different release profiles and hence, different pharmacokinetic profiles. Pharmaceutical companies have implemented strategies to tune the API release profile of the APIs, according to the needs in each formulation. There are many different types of formulations that combine two or more drugs and a few examples of FDC manufacturing processes are described below (Fig. 1).

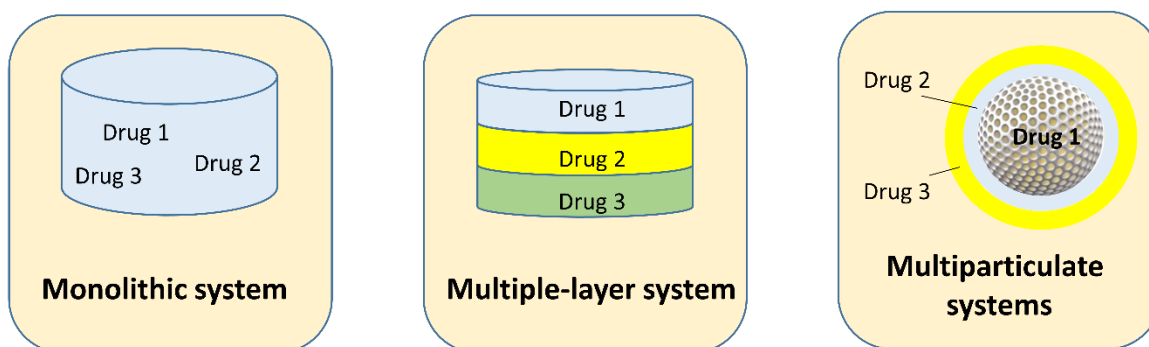


Figure 1: Types of FDC systems, including monolithic, multiple-layer and multiparticulate systems.

Single-layer formulations (monolithic systems) are the most commonly used FDC systems and are the easiest system to be manufactured. Monolithic systems are usually produced in cases where similar dissolution rates for each drug are required. However, the compatibility among APIs is the most critical factor (Desai et al., 2013). Multiple-layer systems are challenging to engineer and this approach usually takes place when APIs are chemically incompatible or different dissolution profiles are required within the same dosage form. Multiple-layered tablets can be obtained by combining wet and dry granulation, utilizing different methods for each drug. The result is a formulation with sustained release and immediate release compartments (Mandal, 2008). Hot melt co-extrusion (HME) of two or more drug-loaded formulations can also be utilised in manufacturing FDC products (Kelleher et al., 2018). Drug loading ranging from 50 to 80-90 % w/w is feasible to achieve by HME, being more patient-friendly and a green technology free of solvents (Desai et al., 2013; Vynckier et al., 2014). HME can enhance physico-chemical stability of moisture-sensitive compounds; however, its use in thermo-labile molecules is limited and black particles can appear due to the long exposition of the compounds to the high temperature of the extruder (Desai et al., 2013). A novel approach has been developed in the manufacturing of multiple-layer

systems based on 3D printing. In the case of 3D-printed tablets manufactured by stereolithography (SLA), drugs and photoinitiators are dissolved in a compatible solvent to be later poured into a resin tray for printing (Robles-Martinez et al., 2019); while fused-deposition modelling (FDM) produces 3D-printed formulations by extruding drug-loaded filaments at a temperature above the melting point of the mixture. Thermo-sensitive compounds may not be suitable for this technique unless polymers with low glass-transition temperature (T_g) are employed (Khaled et al., 2015). The advantages of combining different drugs in multiple layers, compared to monolithic systems, is that they provide simplified treatment regimens, greater patient compliance and an improvement in chemical stability (Desai et al., 2013).

Multiparticulate systems could be a good alternative to manufacture FDC products due to its higher simplicity for R&D and scale-up in pharmaceutical industry. The most commonly used multiparticulate systems including more than two drugs for oral administration are pellets or granules to produce tablets or capsules. These systems are usually obtained by wet granulation, extrusion and spheronization followed by drying and, once they become dry, spray-coating is utilised. Fundamentals of spray-coating are very similar to spray-drying, which is a solvent based technique where the solution is atomised and dried (Ziaee et al., 2019) and the droplets are deposited around the core surface. Fluidised-bed spray-coating is useful to control the smoothness of the layer and the drug release. In contrast, melt granulation, for example, HME or melt-spray-congelating (MSC), allows the control of the smoothness of the layer, but also the particle size and density (Caldwell and Kaushal, 2017). FDC pellets can be also obtained by supercritical fluids or by soaking highly porous pellets into a solution containing the APIs followed in both cases by spray-coating. Multiparticulate systems allow an immediate release of the drug from the coating layer and a sustained release of the drug inside the core (Desai et al., 2013). The release profile is usually modulated by pulsatile mechanisms based on pH and osmotic gradient, but also erosion, diffusion and enzymatic degradation (Caldwell and Kaushal, 2017). Coating technology can be also utilised to obtain solid dosage forms with two or more drugs with tuned release profile (Serrano et al., 2018), keeping the sustained release molecule inside a core and immediately release compounds in different coating layers minimizing the interactions between APIs. To separate the active compounds, sometimes an intermediate inert layer can be spray-layered between the core and the active layer or between two active layers. In the case of an acid or base labile molecule, the more physico-chemically stable molecule is usually located in the core, while the labile molecule is entrapped in an active coating that provides a higher drug/excipient ratio, decreasing the number of excipient sites which are available to react within the acid pH of the stomach and increasing the stability when administered (Desai et al., 2013). Ideally, from a quality by design (QbD) point of view, the amount of coating should be the minimum required to achieve the target product profile (TPP) (Caldwell and Kaushal, 2017), being especially important in children and populations with special needs where the toxicological constraints are more stringent than for patients in general (Krause, 2008).

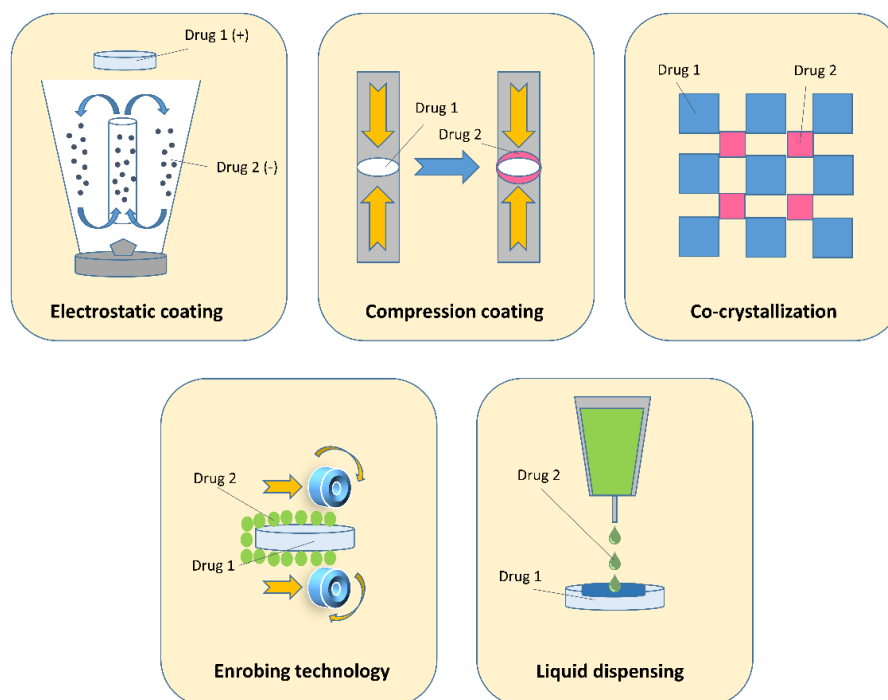


Figure 2: Novel techniques in the manufacturing of FDC systems.

Apart from the above mentioned techniques, other approaches have been developed in the last years to formulate FDC products, including electrostatic coating, compression coating technology, co-crystallization, enrobing technology and liquid dispensing technology (Fig. 2).

These techniques are less commonly utilised by pharmaceutical industries. Electrostatic coating consists on applying an electrostatic charge in the core and spray opposite-charged molecules, which are deposited onto the core and later heated up to 70-100 °C for coating adhesion obtaining a high yield. Thermo-labile drugs are not suitable for this technique and there are specific requirements for the utilised materials in terms of conductivity (Desai et al., 2013). Regarding compression coating technique, a drug-loaded tablet previously obtained by direct compression is placed back in a tableting machine for a second compression, obtaining a compression-coated compartment, resulting in an appropriate technology for temperature and solvent sensitive molecules (Desai et al., 2013). Co-crystallization approach consist in crystallizing two or more drugs with excipients from a solvent to improve compressibility or dissolution rate (Walsh et al., 2018c). In this case, it is critical the selection of the solvent as it should not modify the polymorphic form of the APIs (Desai et al., 2013). The main disadvantage is the need of directly compressible excipients, increasing the production cost (Gohel and Jogani, 2005). Co-crystallization involves different techniques which can be applicable in FDC manufacturing, including spray-drying and HME (Walsh et al., 2018a; Walsh et al., 2018b). Enrobing technology consists on utilizing a preformed drug-loaded core that is later enrobed within a gelatin-made film containing the drug, which would be stretched around the core and sealed edge-to-edge, encircling the core (Desai et al., 2013). Liquid dispensing technology is a technology developed by GSK which permits the

production of FDC tablets by dispensing a liquid drug-loaded formulation onto the surface of a bi-concave core, which can be previously manufactured by direct compression (Clarke and Doughty, 2017; Desai et al., 2013). The liquid formulation, consisting on API with a polymer and excipients dissolved in organic solvents, is deposited on the concave feature and confined to the tablet, followed by the evaporation of the solvent and the formation of a thin film coating (Clarke and Doughty, 2017).

5. NOVEL TECHNOLOGICAL APPROACHES APPLIED IN FDC IN ANTIMICROBIAL THERAPY

FDC products for oral administration have traditionally involved granules, tablets or pellets filled within capsules. However, new approaches have been developed in the last few years to modify the behavior of the APIs in combination, including amorphous solid dispersions, nanosuspensions, tablets obtained by 3D printing instead of direct compression. FDC systems under development are described in table 4.

Supersaturated drug delivery systems (SDDS), especially those self-nanoemulsifying systems (SNEDDS) could be a promising strategy to increase the bioavailability of biopharmaceutical classification system (BCS) class II drugs, due to the generation of a supersaturated solution of the drug in the intestinal lumen for several hours (Smith et al., 2018). SDDS based on FDC amorphous solid dispersions were developed, utilizing sulfamethoxazole and trimethoprim (cotrimoxazole) to treat the pneumonia caused by *Pneumocystis jirovecii*, and Eudragit® EPO as the polymeric carrier. The formulation was undergone to supersaturation studies instead of traditional *in vitro* dissolution assays, establishing non-sink conditions, which resulted in a similar release profile for sulfamethoxazole and trimethoprim. Apart from that, the *in vitro* activity of the amorphous solid dispersions was evaluated, resulting in 2-fold higher efficacy against *Staphylococcus aureus* than a suspension containing both drugs (Mendes et al., 2019).

Nanosuspensions containing darunavir and ritonavir to control the HIV infection were obtained by bottom-up antisolvent precipitation technique followed by ultrasonication using Poloxamer® 407 as aqueous stabilizer. *In vitro* dissolution studies exhibited a similar release profile for both drugs at pH 1.2; however, this profile changed at pH 4.5 and pH 6.8, which promoted a burst release rate for ritonavir. Dissolution rate for both drugs was improved for nanosuspensions in comparison with the tested unprocessed drug (Mehta et al., 2019).

Single-compartment 3D-printed tablets containing efavirenz, tenofovir and emtricitabine were developed and compared with Atripla® to control the HIV infection. A sludge was obtained by hydrating hydroxyethylcellulose ethoxylate quaternised (PQ10) with deionised water. APIs were mixed in methanol and later with the PQ10. Finally, humic acid cellulose acetate phthalate was added and the mixture was extruded in a 3D-Bioplotter®. *In vitro* release studies showed a sustained of the three drugs. While the release of efavirenz was sustained over 24 hours, tenofovir and emtricitabine showed a burst release during the first 4 hours (Siyawamwaya et al., 2019).

Dry powder inhalers containing ciprofloxacin, gatifloxacin and lysozyme were developed for pulmonary administration against respiratory infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. Dry particles were prepared by spray-drying, obtaining two systems: a binary combination of ciprofloxacin and gatifloxacin and ternary mixture of ciprofloxacin, gatifloxacin and lysozyme. Aerodynamic size measured by next generation impactor was performed and results showed that the two combinations achieved in a good delivery efficiency with a fine particle fraction of approximately 40 %, while a synergistic action between ciprofloxacin and gatifloxacin was observed *in vitro* (Heng et al., 2013).

Dual-compartment 3D-printed tablets containing isoniazid and rifampicin to treat tuberculosis were obtained by combining HME followed by FDM (Konta et al., 2017). Both APIs were combined separately with polyethyleneoxide (PEO) (70:30, w:w ratio) and extruded using a twin-screw lab-scale extruder, obtaining two different loaded filaments. The 3D-printing process was divided in three steps: first, a polylactic acid filament was used to print an external shell, which determined the two compartments where the drugs would be located; later, the isoniazid and rifampicin extrudates were loaded manually inside the compartments, and, finally, a polyvinyl alcohol cap was printed to seal the 3D-printed capsule. *In vitro* release was tested for the free filaments and 3D-printed tablets (with and without the PVA cap). A sustained release from the tablet compared with the free filaments was observed, but also a marked delay in the drug release for the capped systems in comparison with the unsealed ones. However, the release of rifampicin was prolonged when compared with the isoniazid (Genina et al., 2017).

Nevirapine and stavudine co-crystals were obtained by spray-drying and formulated in FDC tablets, utilizing lamivudine along with different excipients, such as lactose, corn starch, croscarmellose sodium, colloidal anhydrous silica and magnesium stearate. Co-processed tablets showed an enhanced dissolution profile compared to a control FDC tablets containing the three APIs (Mohammed et al., 2008).

Table 4: Novel FDC formulations with antimicrobial activity. Key: PEO (polyethylene oxide), PLA (polylactic acid), PVA (polyvinyl alcohol).

Formulation	Drug	Excipients	Therapeutic use	Release profile	Efficacy	References
Amorphous solid dispersions	Sulfamethoxazole Trimethoprim	Eudragit® EPO	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Similar release profile for both APIs	Amorphous solid dispersions resulted 2-fold more effective than drug suspension	(Mendes et al., 2019)
Nanosuspensions	Darunavir Ritonavir	Poloxamer® 407	HIV	Higher release rate was achieved for nanosuspensions than pure drug	Not reported	(Mehta et al., 2019)
3D-printed tablets	Efavirenz Tenofovir Emtricitabine	Humic acid Hydroxyethyl cellulose Cellulose acetate phthalate	HIV	Tenofovir and emtricitabine exhibited a burst release during 4 h, while efavirenz showed a sustained release	Not reported	(Siyawamwaya et al., 2019)
DPI	Ciprofloxacin Gatifloxacin Lysozyme	Not reported	Respiratory infections	Good lung deposition (approximately 40 %)	A synergistic action was found between ciprofloxacin and gatifloxacin against <i>P. aeruginosa</i>	(Heng et al., 2013)
3D-printed tablets	Isoniazid	PEO	Tuberculosis	A sustained release was achieved for both	Not reported	(Genina et al., 2017)

	Rifampicin	PLA PVA		drugs, with a slower release rate for rifampicin		
Tablets	Nevirapine Stavudine Lamivudine	Lactose (FlowLac®) Corn starch Croscarmellose sodium Colloidal anhydrous silica Magnesium stearate	HIV	Dissolution rate was enhanced for the three drugs compared to reference formulation	Not reported	(Mohammed et al., 2008)

6. FDCs UNDER CLINICAL TRIALS

Daily administration tablets containing 40 mg of dihydroartemisin and 320 mg of piperazine (Eurartesim®: coated tablets utilizing starch, dextrin, hypromellose, sodium croscarmellose and magnesium stearate in the core and hypromellose, titanium dioxide and polyethylene glycol 400 in the coating (EMA, 2016)) were evaluated in Indonesia to prevent malaria infection (Ahmed et al., 2019). With the aim of evaluating the previously mentioned formulation, an open-label, two-site, three-arm, cluster-randomised, superiority-trial was performed in pregnant women (n=78) in eastern Indonesia, where *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* are endemic. At the beginning of the study, temperature, blood pressure, weight and mid-upper arm circumference were measured for all the patients. A blood sample was taken for microscopy, molecular diagnostic, immunological analysis and measurement of hemoglobin concentration, and the first dose (4 mg/kg/day dihydroartemisinin, 18 mg/kg/day piperazine) was provided with a glass of water, with a programmed visit on day 3 to evaluate medication compliance and tolerance. A maternal blood sample was withdrawn to evaluate the same parameters before and after delivery. Also, placental and umbilical-cord blood samples for histological studies, malaria rapid diagnostic test, microscopy, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and PCR (Dea-Ayuela et al., 2018), as well as congenital abnormalities detection in the newborns were tested. The clinical trial resulted in a 41 % decrease in the prevalence of the malaria infection at delivery and during pregnancy and a 78 % decrease in the incidence of clinical malaria during pregnancy for the two tested strains of *Plasmodium* spp (Ahmed et al., 2019).

A FDC tablet containing sofosbuvir and velpatasvir (400 and 100 mg, respectively, Epclusa®) was studied in 62 sites in North America, Europe and Asia in patients with chronic HCV infection (Asselah et al., 2019). Epclusa® consisted in a coated tablet containing copovidone, microcrystalline cellulose, sodium croscarmellose and magnesium stearate in the core and polyvinyl alcohol, titanium dioxide, polyethylene glycol, talc and red iron oxide. An open-label, single-group, phase 3 study was conducted in 111 patients with HCV RNA > 15 IU/ml. The subjects received the treatment administered daily for 12 weeks. Blood samples were obtained to quantify the HCV RNA levels and determine the HCV genotype and subtype, but also to detect the appearance of resistances. The trial resulted in 97 % of sustained virological response after 12 weeks, including all patients with cirrhosis and patients with previous treatment experience in whom resistances appeared in 36 % of the cases (Asselah et al., 2019).

In 2006, a multiple country, multicenter study, open-label randomised trial was carried out to assess efficacy and toxicity of a novel FDC product in new diagnosed tuberculosis patients. The trial consisted on the daily administration of a FDC tablet combining ethambutol, isoniazid, rifampicin and pyrazinamide during 8 weeks, followed by the administration of a FDC tablet containing rifampicin and isoniazid three-times a week during 18 weeks. The trial formulations were compared to the administration of the same drugs, presented in separated dosage forms. Sputum samples were collected at every at each visit and evaluated by Ziehl-Neelsen or

fluorescence microscopy to determine the presence of the bacteria, but also a sputum-culture was performed to examine the resistance of the *M. tuberculosis* to the administered drugs. Results indicated a favorable outcome in 93.9 % of patients treated with the FDC product by the end of the study (Lienhardt et al., 2011; NIH, 2006).

7. CONCLUDING REMARKS

FDC medicines have become a useful tool to reduce pill burden in pathologies that require more than one drug, as well as for poly-medicated patients. The manufacturing of a single pill that combines different APIs with several release profile kinetics has been a great achievement to improve patient compliance. Physicochemical drug interactions have been sorted out by separating the APIs in different layers or isolated drug compartments. However, pharmacodynamic interactions remain still a big challenge, as well as the difficulty to adjust the drug dose to each individual patient. Industrial manufacturing of FDC for antimicrobial drugs is challenging bearing in mind the wide physicochemical portfolio of the APIs which can limit the temperature used during HME (thermolabile drugs) or the stability in certain solvents utilied for spray drying or spray coating. Novel approaches for the fabrication of FDCs, such as 3D-printing, are under development and could have a high impact in the fabrication of FDC medicines in hospital and community pharmacies, making feasible personalised therapies and promoting patient compliance. The implementation of quality by design tools is key to ensure the correct development of FDC products. Standardised protocols of fabrication are required to minimize interactions and carefully adjust drug release and oral bioavailability.

8. REFERENCES

- AEMPS, 2008a. Coaprovel, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/98086012/FT_98086012.html (accessed on: 27th September 2019)
- AEMPS, 2008b. Combivir, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/98058001/FT_98058001.html (accessed on: 2nd December 2019)
- AEMPS, 2010. Truvada, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/04305001/FT_04305001.html (accessed on: 2nd December 2019)
- AEMPS, 2011a. Kaletra, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/01172006/FT_01172006.html (accessed on: 2nd December 2019)
- AEMPS, 2011b. Trizivir, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/100156004/FT_100156004.html (accessed on: 2nd December 2019)
- AEMPS, 2012. Atripla, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/07430001/FT_07430001.html (accessed on: 2nd December 2019)
- AEMPS, 2014a. EllaOne, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/109522003/FT_109522003.pdf (accessed on: 2nd December 2019)
- AEMPS, 2014b. Harvoni, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/114958001/FT_114958001.pdf (accessed on: 5th October 2019)
- AEMPS, 2014c. Kivexa, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/04298002/FT_04298002.html (accessed on: 2nd December 2019)
- AEMPS, 2014d. Rezolsta, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/114967001/FT_114967001.pdf (accessed on: 2nd December 2019)
- AEMPS, 2015a. Dolocatil codeine, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/61757/FT_61757.html (accessed on: 27th December 2019)
- AEMPS, 2015b. Evotaz, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1151025001/FT_1151025001.pdf (accessed on: 2nd December 2019)
- AEMPS, 2015c. Genvoya, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1151061001/FT_1151061001.pdf (accessed on: 2nd December 2019)
- AEMPS, 2016a. Descovy, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1161099003/FT_1161099003.pdf (accessed on: 2nd December 2019)

AEMPS, 2016b. Epclusa, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1161116001/FT_1161116001.html (accessed on: 5th October 2019)

AEMPS, 2016c. Eviplera, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/11737001/FT_11737001.pdf (accessed on: 2nd December 2019)

AEMPS, 2016d. Odefsey, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1161112001/FT_1161112001.pdf (accessed on: 2nd December 2019)

AEMPS, 2016e. Zepatier, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1161119001/FT_1161119001.html (accessed on: 5th October 2019)

AEMPS, 2017a. Ilvico, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/33844/FT_33844.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2017b. Septrin Forte, data sheet, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/58501/FT_58501.html (accessed on: 2nd December 2019)

AEMPS, 2017c. Symtuza, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1171225001/FT_1171225001.pdf (accessed on: 2nd December 2019)

AEMPS, 2017d. Vosevi, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1171223001/FT_1171223001.html (accessed on: 5th October 2019)

AEMPS, 2017e. Zaldivar, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/65149/FT_65149.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2018a. Anasma Accuhaler, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/62839/FT_62839.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2018b. Biktarvy, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1181289001/FT_1181289001.pdf (accessed on: 2nd December 2019)

AEMPS, 2018c. Capenon HCT, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/73433/FT_73433.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2018d. Couldina with acetylsalicylic acid, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/60954/FT_60954.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2018e. Juluca, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1181282001/FT_1181282001.html (accessed on: 2nd December 2019)

AEMPS, 2018f. Meliane, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/62031/FT_62031.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2018g. Norlevo, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/67770/FT_67770.html (accessed on: 2nd December 2019)

AEMPS, 2018h. Stribild, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/113830001/FT_113830001.html (accessed on: 2nd December 2019)

AEMPS, 2018i. Symbicort forte Turbuhaler, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/65044/FT_65044.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2018j. Targin, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/71124/FT_71124.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2018k. Yasmin, data sheet. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/63575/FT_63575.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2018l. Yaz, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/70093/FT_70093.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2019a. Caduet, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/67326/FT_67326.html (accessed on: 4th November 2019)

AEMPS, 2019b. Frenadol complex, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/49269/FT_49269.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2019c. Maviret, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1171213001/FT_1171213001.html (accessed on: 2nd December 2019)

AEMPS, 2019d. Rilast Turbuhaler, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/64353/FT_64353.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2019e. Tarka, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/61369/FT_61369.html (accessed on: 27th September 2019)

AEMPS, 2019f. Triumeq, data sheet. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/114940001/FT_114940001.html (accessed on: 2nd December 2019)

Afdhal, N., Zeuzem, S., Kwo, P., Chojkier, M., Gitlin, N., Puoti, M., Romero-Gomez, M., Zarski, J.P., Agarwal, K., Buggisch, P., Foster, G.R., Brau, N., Buti, M., Jacobson, I.M., Subramanian, G.M., Ding, X., Mo, H., Yang, J.C., Pang, P.S., Symonds, W.T., McHutchison, J.G., Muir, A.J., Mangia, A.,

- Marcellin, P., Investigators, I.O.N., 2014. Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 370, 1889-1898.
- Ahmed, R., Poespoprodjo, J.R., Syafruddin, D., Khairallah, C., Pace, C., Lukito, T., Maratna, S.S., Asih, P.B.S., Santana-Morales, M.A., Adams, E.R., Unwin, V.T., Williams, C.T., Chen, T., Smedley, J., Wang, D.L., Faragher, B., Price, R.N., ter Kuile, F.O., 2019. Efficacy and safety of intermittent preventive treatment and intermittent screening and treatment versus single screening and treatment with dihydroartemisinin-piperaquine for the control of malaria in pregnancy in Indonesia: a cluster-randomised, open-label, superiority trial. *Lancet Infect Dis* 19, 973-987.
- Aidsmap, 2019. Types of antiretroviral medications. Aidsmap. Available from: <http://www.aidsmap.com/about-hiv/types-antiretroviral-medications> (accessed on: 2nd December 2019)
- Aronson, J.K., 2004. Medication errors resulting from the confusion of drug names. *Expert Opin Drug Saf* 3, 167-172.
- Asselah, T., Shafran, S.D., Bourgeois, S., Lai, C.L., Mathurin, P., Willems, B., Nguyen, M.H., Davis, M.N., Huang, K.C., Svarovskaia, E., Osinusi, A., McNally, J., Brainard, D.M., Shaikh, O.S., Tran, T.T., 2019. Deferred treatment with a fixed-dose combination of sofosbuvir-velpatasvir for chronic hepatitis C virus genotype 1, 2, 4 and 6 infection. *J Viral Hepat* 26, 1229-1232.
- Biswas, P., Tambussi, G., Lazzarin, A., 2007. Access denied? The status of co-receptor inhibition to counter HIV entry. *Expert Opin Pharmacother* 8, 923-933.
- Blomberg, B., Spinaci, S., Fourie, B., Laing, R., 2001. The rationale for recommending fixed-dose combination tablets for treatment of tuberculosis. *Bull World Health Organ* 79, 61-68.
- Bourliere, M., Pietri, O., 2019. Hepatitis C virus therapy: No one will be left behind. *Int J Antimicrob Ag* 53, 755-760.
- Caldwell, W., Kaushal, M., 2017. Multiparticulate Technologies for Fixed-Dose Combinations, pp. 155-168.
- Clarke, A., Doughty, D., 2017. Development of Liquid Dispensing Technology for the Manufacture of Low Dose Drug Products, *Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals*, pp. 551-575.
- Collier, R., 2012. Reducing the "pill burden". *Can Med Assoc J* 184, E117-E118.
- Dea-Ayuela, M.A., Galiana-Rosello, C., Lalatsa, A., Serrano, D.R., 2018. Applying Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) in the Diagnosis of Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiasis as Point-of-Care Tests (POCTs). *Current Topics in Medicinal Chemistry* 18, 1358-1374.
- Desai, D., Wang, J., Wen, H., Li, X., Timmins, P., 2013. Formulation design, challenges, and development considerations for fixed dose combination (FDC) of oral solid dosage forms. *Pharm Dev Technol* 18, 1265-1276.
- Dhillon, S., 2010. Tramadol/Paracetamol Fixed-Dose Combination A Review of its Use in the Management of Moderate to Severe Pain. *Clin Drug Invest* 30, 711-738.
- EMA, 2016. Eurartesim, data sheet. European Medicines Agency. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/eurartesim-epar-product-information_es.pdf (accessed on: 2nd December 2019)
- Farrell, B., Shamji, S., Monahan, A., French Merkley, V., 2013. Reducing polypharmacy in the elderly: Cases to help you "rock the boat". *Can Pharm J (Ott)* 146, 243-244.
- FDA, 1980. Drugs@FDA Approved Drug Products: estradiol cypionate; testosterone cypionate. U.S. Food & Drug Administration. Available from:

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=017968> (accessed on: 27th September 2019)

FDA, 2015. Drugs@FDA Approved Drug Products: Dutrebis, U.S. Food & Drug Administration. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=206510> (accessed on: 2nd December 2019)

FDA, 2018a. Drugs@FDA Approved Drug Products: Cimduo, U.S. Food & Drug Administration. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=022141> (accessed on: 2nd December 2019)

FDA, 2018b. Drugs@FDA Approved Drug Products: Symfi. U.S. Food & Drugs Administration. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=022142> (accessed on: 2nd December 2019)

FDA, 2018c. Drugs@FDA Approved Drugs Products: Delstrigo. U.S. Food & Drug Administration. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=210807> (accessed on: 2nd December 2019)

FDA, 2019. Drugs@FDA Approved Drugs Products: Dovato. U.S. Food & Drug Administration. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=211994> (accessed on: 2nd December 2019)

Gautam, C.S., Saha, L., 2008. Fixed dose drug combinations (FDCs): rational or irrational: a view point. *Br J Clin Pharmacol* 65, 795-796.

Genina, N., Boetker, J.P., Colombo, S., Harmankaya, N., Rantanen, J., Bohr, A., 2017. Anti-tuberculosis drug combination for controlled oral delivery using 3D printed compartmental dosage forms: From drug product design to in vivo testing. *Journal of Controlled Release* 268, 40-48.

Gohel, M.C., Jogani, P.D., 2005. A review of co-processed directly compressible excipients. *J Pharm Pharm Sci* 8, 76-93.

Gulick, R.M., Mellors, J.W., Havlir, D., Eron, J.J., Gonzalez, C., McMahon, D., Richman, D.D., Valentine, F.T., Jonas, L., Meibohm, A., Emini, E.A., Chodakewitz, J.A., 1997. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *New Engl J Med* 337, 734-739.

Hancox, R.J., 2006. Interactions between corticosteroids and beta(2)-agonists. *Clin Rev Allerg Immu* 31, 231-245.

Hao, J., Rodriguez-Monguio, R., Seoane-Vazquez, E., 2016. Fixed-dose combination and single active ingredient drugs: a comparative cost analysis. *Expert Rev Pharm Out* 16, 127-134.

Heng, D., Lee, S., Teo, J., Ng, W., Chan, H.-K., Tan, R., 2013. Synergistic Combination Dry Powders for Inhaled Antimicrobial Therapy. *AIP Conference Proceedings* 1542, 113-116.

Kelleher, J.F., Gilvary, G.C., Madi, A.M., Jones, D.S., Li, S., Tian, Y., Almajaan, A., Senta-Loys, Z., Andrews, G.P., Healy, A.M., 2018. A comparative study between hot-melt extrusion and spray-drying for the manufacture of anti-hypertension compatible monolithic fixed-dose combination products. *Int J Pharmaceut* 545, 183-196.

- Khaled, S.A., Burley, J.C., Alexander, M.R., Yang, J., Roberts, C.J., 2015. 3D printing of five-in-one dose combination polypill with defined immediate and sustained release profiles. *J Control Release* 217, 308-314.
- Khouri, A.S., Realini, T., Fechtner, R.D., 2008. Fixed-Combination Drugs, in: Netland, P.A. (Ed.), *Glaucoma Medical Therapy*, Second Edition ed. Oxford University Press, pp. 139-149.
- Konta, A.A., García-Piña, M., Serrano, D.R., 2017. Personalised 3D Printed Medicines: Which Techniques and Polymers Are More Successful? *Bioengineering (Basel)* 4, 79.
- Krause, J., Breitreutz, J., 2008. Improving Drug Delivery in Paediatric Medicine. *Pharm Med* 22, 41-50.
- Lienhardt, C., Cook, S.V., Burgos, M., Yorke-Edwards, V., Rigouts, L., Anyo, G., Kim, S.-J., Jindani, A., Enarson, D.A., Nunn, A.J., Study C Trial Group, f.t., 2011. Efficacy and Safety of a 4-Drug Fixed-Dose Combination Regimen Compared With Separate Drugs for Treatment of Pulmonary Tuberculosis: The Study C Randomized Controlled Trial. *JAMA* 305, 1415-1423.
- Lung, T., Jan, T., de Silva, H.A., Guggilla, R., Maulik, P.K., Naik, N., 2019. Fixed-combination, low-dose, triple-pill antihypertensive medication versus usual care in patients with mild-to-moderate hypertension in Sri Lanka: a within-trial and modelled economic evaluation of the TRIUMPH trial. *The Lancet* 7, 1359-1366.
- Mandal, U., Kumar-Pal, T., 2008. Formulation and In Vitro Studies of a Fixed-Dose Combination of a Bilayer Matrix Tablet Containing Metformin HCl as Sustained Release and Glipizide as Immediate Release. *Drug Dev Ind Pharm*, 305-313.
- Manns, M.P., Wedemeyer, H., Cornberg, M., 2006. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* 55, 1350-1359.
- Marks, K., Naggie, S., 2019. Management of Hepatitis C in 2019. *JAMA*.
- Mazori, D.R., 2019. The ABCs of COCs: A Guide for Dermatology Residents on Combined Oral Contraceptives. *Cutis* 104, E10-E14.
- Mehta, C.H., Narayan, R., Aithal, G., Pandiyan, S., Bhat, P., Dengale, S., Shah, A., Nayak, U.Y., Garg, S., 2019. Molecular simulation driven experiment for formulation of fixed dose combination of Darunavir and Ritonavir as anti-HIV nanosuspension. *Journal of Molecular Liquids* 293, 111469.
- Mendes, C., Valentini, G., Chamorro, A.F., Pinto, J.M.O., Silva, M.A.S., Parize, A.L., 2019. Supersaturating drug delivery system of fixed drug combination: sulfamethoxazole and trimethoprim. *Expert Rev Anti Infect Ther*.
- Mirbagheri, S.A., Hasibi, M., Abouzari, M., Rashidi, A., 2006. Triple, standard quadruple and ampicillin-sulbactam-based quadruple therapies for *H. pylori* eradication: a comparative three-armed randomized clinical trial. *World J Gastroenterol* 12, 4888-4891.
- Mohammed, G.A., Puri, V., Bansal, A.K., 2008. Coprocessing of Nevirapine and Stavudine by Spray Drying. *Pharmaceutical Development and Technology* 13, 299-310.
- Moore, R.D., Chaisson, R.E., 1999. Natural history of HIV infection in the era of combination antiretroviral therapy. *Aids* 13, 1933-1942.
- Moriarty, F., Bennett, K., Fahey, T., 2019. Fixed-dose combination antihypertensives and risk of medication errors. *Heart* 105, 204-209.
- NIH, 2006. Multicenter trial for the evaluation of a fixed combination tablet for the treatment of pulmonary tuberculosis. U.S. National Library of Medicine: ClinicalTrials.gov. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00216333?term=FDC&cond=tuberculosis&draw=2&rank=6> (accessed on: 2nd December 2019)

- Robles-Martinez, P., Xu, X., Trenfield, S.J., Awad, A., Goyanes, A., Telford, R., Basit, A.W., Gaisford, S., 2019. 3D Printing of a Multi-Layered Polypill Containing Six Drugs Using a Novel Stereolithographic Method. *Pharmaceutics* 11.
- Rong, L., Perelson, A.S., 2010. Treatment of hepatitis C virus infection with interferon and small molecule direct antivirals: viral kinetics and modeling. *Crit Rev Immunol* 30, 131-148.
- Sadia, M., Isreb, A., Abbadi, I., Isreb, M., Aziz, D., Selo, A., Timmins, P., Alhnan, M.A., 2018. From 'fixed dose combinations' to 'a dynamic dose combiner': 3D printed bi-layer antihypertensive tablets. *Eur J Pharm Sci* 123, 484-494.
- Salazar-Austin, N., Ordonez, A.A., Hsu, A.J., Benson, J.E., Mahesh, M., Menachery, E., Razeq, J.H., Salfinger, M., Starke, J.R., Milstone, A.M., Parrish, N., Nuernberger, E.L., Jain, S.K., 2015. Extensively drug-resistant tuberculosis in a young child after travel to India. *Lancet Infect Dis* 15, 1485-1491.
- Schlosser, R., 2019. Fixed-Dose and Fixed-Ratio Combination Therapies in Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes* 43, 440-444.
- Serrano, D.R., Walsh, D., O'Connell, P., Mugheirbi, N.A., Worku, Z.A., Bolas-Fernandez, F., Galiana, C., Dea-Ayuela, M.A., Healy, A.M., 2018. Optimising the in vitro and in vivo performance of oral cocrystal formulations via spray coating. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 124, 13-27.
- Siyawamwaya, M., du Toit, L.C., Kumar, P., Choonara, Y.E., Kondiah, P., Pillay, V., 2019. 3D printed, controlled release, tritherapeutic tablet matrix for advanced anti-HIV-1 drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 138, 99-110.
- Sizar, O., Gupta, M., 2019. Opioid Induced Constipation, StatPearls, Treasure Island (FL).
- Smith, L., Serrano, D.R., Mauger, M., Bolas-Fernandez, F., Dea-Ayuela, M.A., Lalatsa, A., 2018. Orally Bioavailable and Effective Buparvaquone Lipid-Based Nanomedicines for Visceral Leishmaniasis. *Mol Pharmaceut* 15, 2570-2583.
- Teixeira, K.S.S., da Cruz Fonseca, S.G., de Moura, L.C.B., de Moura, M.L.R., Borges, M.H.P., Barbosa, E.G., De Lima e Moura, T.F.A., 2018. Use of chemometrics to compare NIR and HPLC for the simultaneous determination of drug levels in fixed-dose combination tablets employed in tuberculosis treatment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 149, 557-563.
- Vynckier, A.K., Dierickx, L., Saerens, L., Voorspoels, J., Gonnissen, Y., De Beer, T., Vervaet, C., Remon, J.P., 2014. Hot-melt co-extrusion for the production of fixed-dose combination products with a controlled release ethylcellulose matrix core. *Int J Pharm* 464, 65-74.
- Walsh, D., Serrano, D.R., Worku, Z.A., Madi, A.M., O'Connell, P., Twamley, B., Healy, A.M., 2018a. Engineering of pharmaceutical cocrystals in an excipient matrix: Spray drying versus hot melt extrusion. *Int J Pharmaceut* 551, 241-256.
- Walsh, D., Serrano, D.R., Worku, Z.A., Madi, A.M., O'Connell, P., Twamley, B., Healy, A.M., 2018b. Engineering of pharmaceutical cocrystals in an excipient matrix: Spray drying versus hot melt extrusion. *Int J Pharmaceut* 551, 241-256.
- Walsh, D., Serrano, D.R., Worku, Z.A., Norris, B.A., Healy, A.M., 2018c. Production of cocrystals in an excipient matrix by spray drying. *Int J Pharmaceut* 536, 467-477.
- Ziaee, A., O'Dea, S., Howard-Hildige, A., Padrela, L., Potter, C., Iqbal, J., Albadarin, A.B., Walker, G., O'Reilly, E.J., 2019. Amorphous solid dispersion of ibuprofen: A comparative study on the effect of solution based techniques. *Int J Pharmaceut*, 118816.

Hipótesis y objetivos

Hypothesis & aims

Hipótesis

La AmB es el fármaco de referencia en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas y leishmaniasis viscerales, pero su estructura química le confiere unas propiedades fisicoquímicas que dificultan su biodisponibilidad por vías diferentes a la parenteral. Conociendo que la AmB puede presentar tres estados de agregación en medio acuoso, es necesario investigar cada estado para obtener formulaciones de AmB con el estado de agregación más apropiado para cada vía de administración. La actividad, toxicidad y farmacocinética de la AmB ha sido ampliamente estudiada, siendo el estado poliagregado el que presenta mejor balance beneficio/riesgo (1-4); sin embargo, los estados de agregación de la AmB no han sido previamente evaluados en términos de interacciones fisicoquímicas, capacidad de difusión y mecanismos de acción preferencial, por lo que es interesante investigar en profundidad todos estos parámetros para establecer una correlación que permita desarrollar nuevas formulaciones de AmB más efectivas y menos tóxicas en base a una modulación de su estado de agregación y teniendo en cuenta la vía de administración requerida.

En el caso de infecciones tópicas, el tratamiento de la leishmaniasis es muy limitado, con tratamientos muy tóxicos; sin embargo, aunque el arsenal terapéutico de las micosis es más amplio, existe un elevado riesgo de aparición de resistencias y falta de eficacia. Por este motivo, el desarrollo de una formulación tópica de AmB que sea permeable y teniendo en cuenta el gran espectro de acción que presenta la molécula, sería muy útil para tratar estas patologías, ya que la vía parenteral no es la más apropiada para llevar a cabo su tratamiento (5).

Por otro lado, el tratamiento de estas infecciones por vía parenteral tampoco es el más adecuado a no ser que se trate de infecciones muy severas. En la actualidad, no existen formas farmacéuticas de administración oral de AmB que presenten un buen perfil de biodisponibilidad oral, eficacia y seguridad al mismo tiempo. Por esta razón, el desarrollo de una formulación para vía oral de AmB sería de gran importancia clínica, ya que se podrían evitar los problemas de toxicidad y resistencias que presenta la miltefosina y, al mismo tiempo, se facilitaría la administración de esta molécula, que actualmente no es la idónea, ya que requiere la hospitalización del paciente para su administración intravenosa y esto no siempre es posible cuando la infraestructura sanitaria es deficiente. La terapia combinada utilizando fármacos con diferentes dianas terapéuticas es una estrategia muy prometedora en la prevención de resistencias, que ha sido ampliamente utilizada en el control de la infección por el VIH. La AmB se ha estudiado en combinación con antifúngicos de la familia de los azoles y miltefosina demostrando un buen potencial terapéutico (6-11). Sin embargo, todos estos fármacos han sido evaluados principalmente de forma individual. Por ello, podría ser útil el desarrollo de terapias combinadas de AmB con agentes microbianos con acción antifúngica y antiparasitaria que, además, presenten en su combinación excipientes naturales y bioactivos para mejorar la biodisponibilidad por vía oral, así como ejercer un efecto protector a nivel gastrointestinal, evitando la aparición de efectos adversos, tales como úlceras y molestias gastrointestinales.

Objetivos

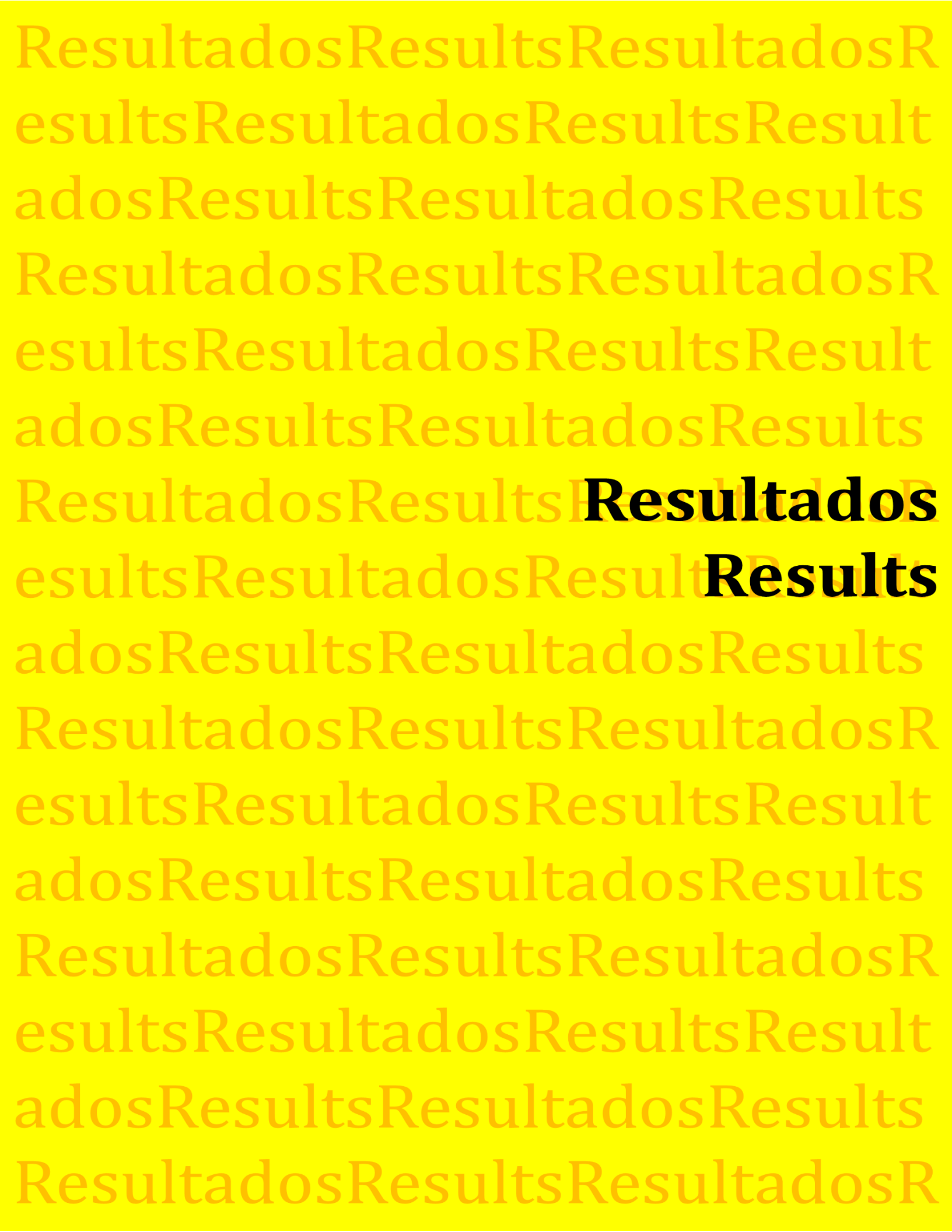
El objetivo principal de esta tesis doctoral fue la caracterización de los tres estados de agregación que presenta la AmB, así como el desarrollo de formulaciones de AmB aptas para vías hasta ahora no utilizadas, como son la vía tópica y oral. Para ello, se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización fisicoquímica y evaluación *in vitro* de los estados de agregación de la AmB. Los resultados descritos en este apartado aparecen reflejados en la **publicación 4**.
 1. Se prepararon los tres estados de agregación a escala de laboratorio utilizando diferentes excipientes y se llevó a cabo una exhaustiva caracterización fisicoquímica en forma líquida (mediante espectrofotometría UV-visible, distribución del tamaño de partícula, microscopía electrónica de transmisión, resonancia magnética nuclear), así como en forma liofilizada (calorimetría diferencial de barrido, análisis termogravimétrico, espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier, difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear).
 2. Se evaluó además la capacidad de difusión, actividad, toxicidad y mecanismo de acción *in vitro* de los tres estados, para posteriormente hacer una relación mediante análisis multivarianza para correlacionar la influencia de la agregación en estas variables.
2. Desarrollo y caracterización de una nueva formulación de AmB para administración por vía tópica. Los procedimientos y resultados de este apartado aparecen descritos en la **publicación 5**.
 1. Se llevó a cabo la optimización de una nueva formulación de transferosomas mediante un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken. La elaboración de la formulación se realizó mediante el método de hidratación en capa fina.
 2. Se realizó una caracterización fisicoquímica (eficacia de encapsulación, tamaño de partícula, estabilidad) y una evaluación *in vitro* de su permeabilidad a través de membranas biológicas y sintéticas, su toxicidad en la epidermis, glóbulos rojos y macrófagos y su actividad frente a *Candida* spp. y *Leishmania* spp.
 3. Se realizaron estudios de farmacocinética *in vivo* en ratón y se evaluó la cantidad de fármaco que penetró en cada una de las capas de la piel mediante la técnica del “tape-stripping”.
3. Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones combinadas de AmB para potenciar su biodisponibilidad por vía oral con el fin de obtener un efecto sinérgico. Los estudios llevados a cabo en esta sección, así como los resultados obtenidos, aparecen reflejados en la **publicación 6**.
 1. Se llevó a cabo el desarrollo de formulaciones combinadas de AmB, itraconazol, miltefosina y alopurinol mediante granulación húmeda y posterior recubrimiento en lecho fluido mediante un diseño de experimentos realizado en dos fases (Taguchi y Box-Behnken).

2. Se realizó una exhaustiva caracterización fisicoquímica (mediante microscopía electrónica de barrido, calorimetría diferencial de barrido, análisis termogravimétrico, espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier, difracción de rayos X, adsorción dinámica de vapor, distribución del tamaño de partícula, determinación de la superficie específica mediante el método Braunauer-Emmett-Teller y estabilidad acelerada y a largo plazo). Además, se realizó una evaluación *in vitro* para evaluar su toxicidad en glóbulos rojos y su actividad frente a *Candida* spp. y *Leishmania* spp.
3. Se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos por vía oral y de eficacia en hámsters infectados con *Leishmania* spp. para evaluar la actividad de estas formulaciones, y su acumulación en plasma y tejidos.

REFERENCIAS

1. Serrano DR, Hernández L, Fleire L, González-Alvarez I, Montoya A, Ballesteros MP, et al. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int J Pharmaceut.* 2013;447(1):38-46.
2. Sánchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S, Bolás F, Alunda JM, Raposo R, et al. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2004;48(9):3246-52.
3. Espada R, Valdespina S, Molero G, Dea MA, Ballesteros MP, Torrado JJ. Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B. *Int J Antimicrob Ag.* 2008;32(1):55-61.
4. López-Sánchez A, Pérez-Cantero A, Torrado-Salmerón C, Martín-Vicente A, García-Herrero V, González-Nicolás MÁ, et al. Efficacy, Biodistribution, and Nephrotoxicity of Experimental Amphotericin B-Deoxycholate Formulations for Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2018;62(7):e00489-18.
5. Fernández-García R, Lalatsa A, Statts L, Bolás-Fernández F, Ballesteros MP, Serrano DR. Transferosomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *Int J Pharmaceut.* 2020;573:118817.
6. van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(3):184-94.
7. van Griensven J, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet.* 2011;377(9764):443-4.
8. Mario DN, Guarro J, Santurio JM, Alves SH, Capilla J. In Vitro and In Vivo Efficacy of Amphotericin B Combined with Posaconazole against Experimental Disseminated Sporotrichosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2015;59(8):5018.
9. Larsen RA, Bauer M, Thomas AM, Graybill JR. Amphotericin B and Fluconazole, a Potent Combination Therapy for Cryptococcal Meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2004;48(3):985.
10. Odds FC. Editorial Commentary: Fluconazole Plus Amphotericin B Combinations Are Not Contraindicated and May Add Benefit for the Treatment of Candidemia. *Clinical Infectious Diseases.* 2003;36(10):1229-31.
11. Hirve S, Kroeger A, Matlashewski G, Mondal D, Banjara MR, Das P, et al. Towards elimination of visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent-Translating research to practice to public health. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(10):e0005889-e.



Resultados

Results



PUBLICACIÓN 4:

Understanding the self-assembly equilibrium process of amphotericin B and its impact on cell membrane interaction and efficacy-toxicity balance

Raquel Fernández-García, Juan C. Muñoz-García, Matthew Wallace, Elena González-Burgos, M. Pilar Gómez Serranillos, Rafaela Raposo, Anne-Marie Healy, Francisco Bolás-Fernández, M. Paloma Ballesteros, Yaroslav Z. Khimyak, Dolores R. Serrano

Pendiente de publicación. Enviado a: PNAS (IF: 9.58, 7/69, Multidisciplinary Sciences, Q1)

ABSTRACT

Understanding the mechanism of action that triggers the activity and the toxicity of antifungal drugs is challenging, considering that exist a dual effect on plasma cell membranes. Antifungal drugs such as amphotericin B (AmB) interact with lipids and phospholipids located on fungal cell membranes which can disrupt them and create pores, leading to cell apoptosis and therefore efficacy. At the same time, the interaction can also take place on cell components from mammalian cells, leading to toxicity. The interplay of AmB self-assembly on the efficacy and toxicity against fungal or mammalian cells is not fully understood yet. AmB has been selected as a model antifungal drug due to the complexity of its chemical structure which can self-assemble in three different aggregation states in aqueous media: monomer, oligomer (also known as dimer) and poly-aggregate. The monomeric state is the most toxic which has been attributed to the high reactive oxygen species production, a less specific mechanism of action compared to the binding of the ergosterol located in plasma cell membrane. On the contrary, dimer and poly-aggregate bind more selectively to the ergosterol of plasma membranes which has been explained by the interaction with excipients and their overall larger particle size limiting their diffusivity. In this work, the effect of the aggregation state on the selective membrane interaction of fungal or mammalian cells was evaluated, performing a detailed physicochemical characterization, haemolytic studies and several *in vitro* assays in different strains of *Candida* spp. Tuning the particle size of AmB formulations is a promising strategy to trigger a more selective response on fungal cells, becoming safer for mammalian cells.

KEYWORDS

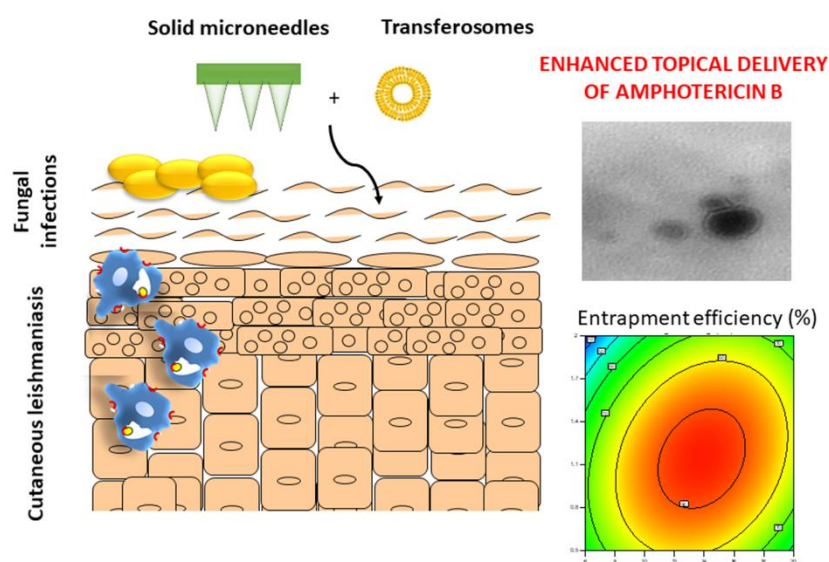
Self-assembly, aggregation, monomer, dimer, poly-aggregate, amphotericin B, antifungal, NMR, haemolysis, *Candida*, ROS.

PUBLICACIÓN 5:

Enhanced transdermal delivery of amphotericin B for the treatment of cutaneous mycoses and leishmaniasis: transferosomes coupled with microneedles

Raquel Fernández-García, Larry Statts, Adriana Bezerra-Souza, Marcia Dalastra Laurenti, María-Auxiliadora Dea-Ayuela, Francisco Bolás-Fernández, M. Paloma Ballesteros, Luiz-Felipe Passero, Aikaterini Lalatsa, Dolores R. Serrano

Pendiente de publicación. Enviado a: Int J Nanomedicine (IF: 4.471, 33/94, Nanoscience & Nanotechnology, Q2; 34/267, Pharmacology & Pharmacy, Q1)



ABSTRACT

Treating cutaneous fungal infections, as well as cutaneous leishmaniasis, is challenging, considering the increase in the appearance of resistances, the lack of novel treatments and the risk of adverse effects of conventional treatments. Nowadays, only few medicines are commercialised to treat these diseases, which can be administered intravenously, topically or intralesionally. However, topical treatments have many disadvantages considering the high variability in efficacy due to lack of permeability when applied topically. Amphotericin B (AmB) was chosen as a model antifungal and anti-parasitic drug due to its dual activity against both pathogens and its high spectrum of action. In this work, quality by design (QbD) was used to obtain a transferosomal formulation (TFs) containing AmB, which was optimized in terms of entrapment efficiency (EE) and particle size. The optimised AmB-TFs exhibited an acceptable particle size (~150 nm), good colloidal stability (-35.02 mV), high EE (93.3 %) and optimal physico-chemical stability (>90% drug content and size < 200 nm) during at least 180 days when the formulation was freeze-dried and stored under both refrigerated and room temperature desiccated conditions. AmB-TF showed a good permeability capacity across mouse skin ($4.91 \pm 0.41 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) and almost 10-fold higher across synthetic Strat-M[®] membranes. The topical *in vivo* permeability led to drug accumulation in deeper regions of the skin (>25 $\mu\text{g}/\text{g}$ skin at 6 h post-administration) ensuring that enough concentration is delivered to the target region of the skin (greater than the IC₅₀ against *Leishmania* parasites). The three *Candida spp.* tested were also susceptible to the AmB-TF formulation. Application of microneedles prior to the topical administration of AmB-TFs formulation resulted in an increase in drug permeation during the first hour, especially in the deeper regions of the skin. In conclusion, AmB-TFs are a promising nanomedicine for cutaneous leishmaniasis and fungal infections, which can be applied in developing countries with lower access to hospitals as no cold chain is required to keep the formulation stable.

KEYWORDS

Amphotericin B, transferosomes, Quality by Design, permeability, haemolysis, *Candida*, *Leishmania*, cytotoxicity, pharmacokinetics, microneedles



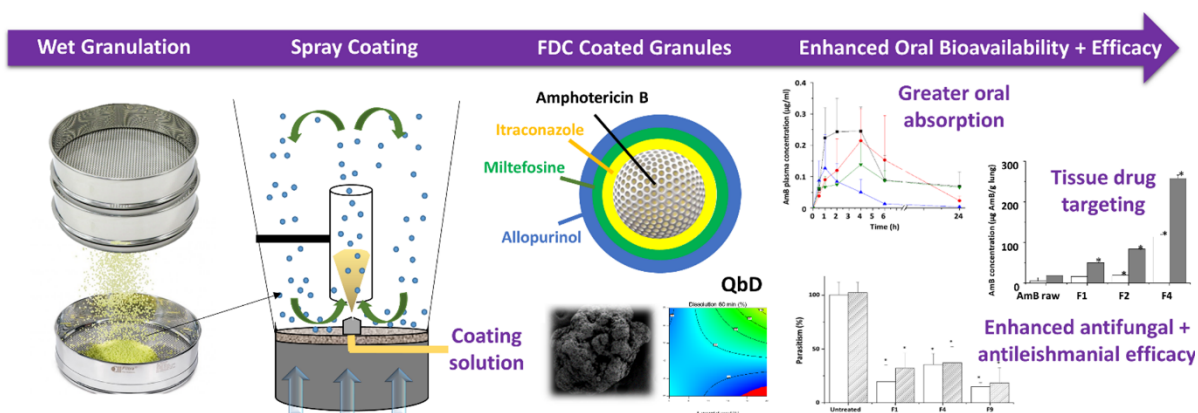
ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

PUBLICACIÓN 6:

Can amphotericin B, itraconazole, miltefosine and allopurinol be co-delivered orally? Tailoring oral fixed-dose combination products for visceral leishmaniasis and systemic mycoses

Raquel Fernández-García, David Walsh, Peter O'Connell, Luiz-Felipe Passero, Adriana Bezerra-Souza, Marcia Dalastra Laurenti, Karla Slowing, María-Auxiliadora Dea-Ayuela, M. Paloma Ballesteros, Francisco Bolás-Fernández, Anne-Marie Healy, Dolores R. Serrano

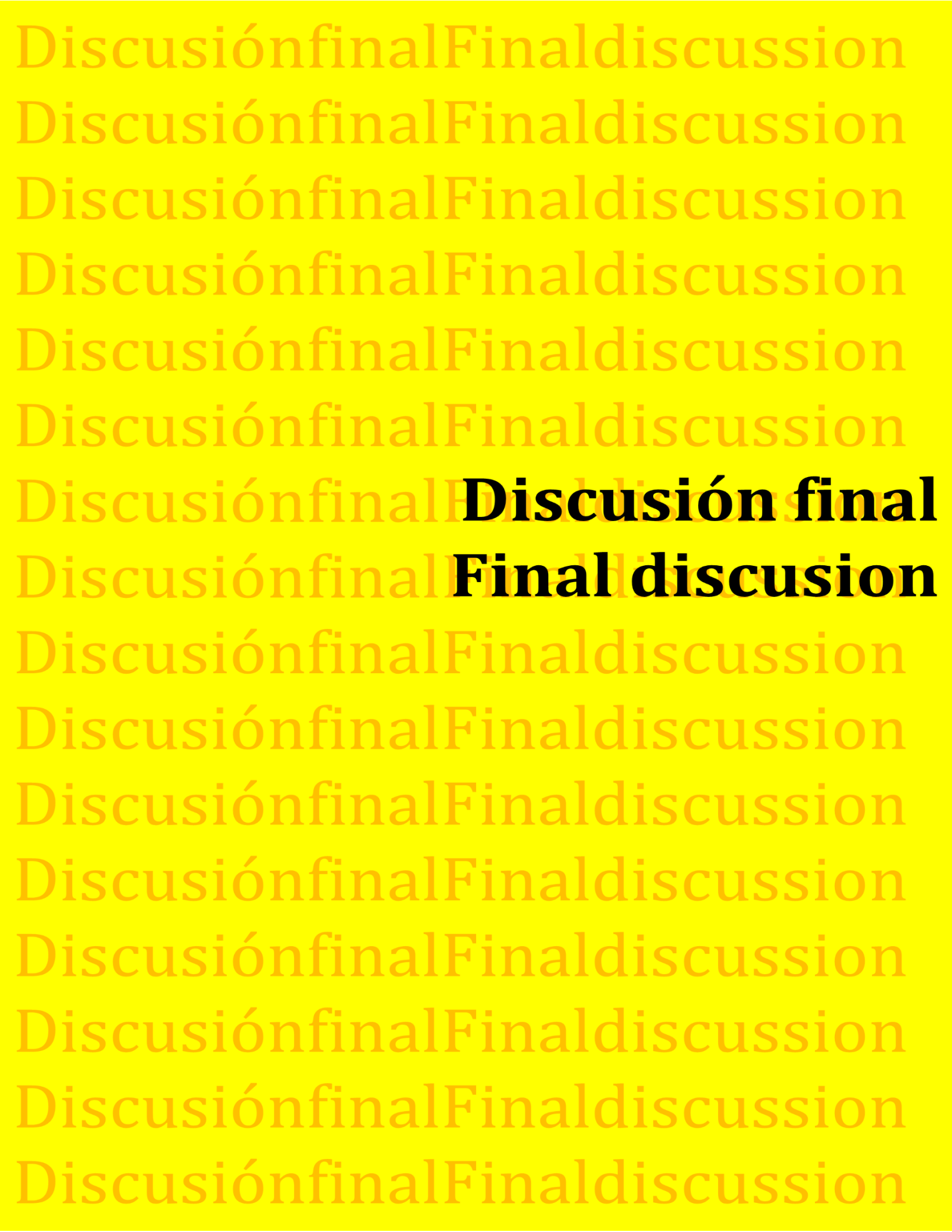
Pendiente de publicación. Enviado a: Mol Pharm (IF: 4.396, 36/136, Medicine, Research & Experimental, Q2; 39/267, Pharmacology & Pharmacy, Q1)



ABSTRACT

An increase in the incidence of visceral leishmaniasis and systemic mycoses has been reported in the recent years. The appearance of resistances is a major issue, as well as the lack of an effective and safe treatment. Amphotericin B (AmB) has been the gold standard in the treatment of antifungal and anti-parasitic infections since its discovery due to its dual activity. However, this molecule has a very low bioavailability being required its parenteral administration leading to severe adverse effects related to the intravenous infusion, anaemia and nephrotoxicity. The coadministration of AmB with other antifungals or antiparasitic drug such as itraconazol, miltefosine or allopurinol can elicit a synergistic pharmacological effect. In this work, an oral fixed-dose combination product for visceral leishmaniasis and systemic mycoses has been engineered, obtaining a sustained release of AmB from 3 to 24 hours and demonstrated *in vivo* efficacy against *Leishmania infantum* in liver and spleen (reduction in the number of parasites of 84.98 and 81.55 %, respectively) with a higher selectivity toward target tissues (liver, spleen and lung) when compared with kidney (up to 4.6, 2.6 and 82.7-fold more selective, respectively).

Key words: oral delivery, amphotericin B, fixed-dose combination, FDC, itraconazole, miltefosine, allopurinol, coating, quality by design, antifungal, antiparasitic



Discusión final

Final discussion

El objetivo principal sobre el que se ha desarrollado esta tesis doctoral ha consistido en el desarrollo de nuevas formulaciones de anfotericina B (AmB) que puedan ser administradas por vías hasta ahora no utilizadas, como son las vías tópica y oral. Para ello, en primer lugar, se realizó un estudio exhaustivo de los tres estados de agregación que presenta la AmB en solución.

El tamaño de partícula y el estado de agregación de la AmB demostraron estar íntimamente ligados y cada uno de los tres estados de agregación mostró unas características fisicoquímicas y un comportamiento *in vitro* muy diferentes. De esta forma, se pueden modificar las características de una formulación con AmB en términos de eficacia, toxicidad y biodistribución.

Dentro de los tres estados de agregación, se desarrolló un algoritmo para poder relacionar el tamaño de partícula de cada uno de los tres estados con su actividad y toxicidad *in vitro*, en el que el estado poli-agregado resultó ser el que presentó mejor balance beneficio-riesgo. En la **publicación 4**, además, se pudo corroborar que la eficacia y toxicidad de los estados de agregación viene determinada por su solubilidad en medio acuoso y el mecanismo de acción que tiene lugar. Por todo ello, el desarrollo de formulaciones con AmB en estado poli-agregado podría resultar beneficioso teniendo en cuenta el amplio margen terapéutico existente entre la IC₅₀ (concentración necesaria para inhibir el crecimiento en el 50 % de los microorganismos) y la HC₅₀ (concentración necesaria para producir toxicidad en el 50 % de los glóbulos rojos), además de una eficacia probada frente a diferentes especies del género *Candida* spp., con un halo de inhibición mayor a 15 mm (1). Sin embargo, el tamaño de partícula debe ser controlado, ya que si la AmB se agrega descontroladamente, puede llegar a formar agregados de un tamaño superior a 5 µm, pudiendo llegar a bloquear vasos y capilares sanguíneos al administrarse por vía intravenosa (2).

La AmB formó complejos de inclusión con γ -ciclodextrinas (γ -CD) en el monómero, sin embargo, formó micelas con el desoxicolato de sodio (NaDC). Debido a su baja solubilidad en agua, la AmB tiende a formar agregados en solución, por lo que, para favorecer la interacción entre la AmB y los excipientes, es necesario alcalinizar el medio hasta pH 12, ya que a este pH, y teniendo en cuenta que la AmB posee dos pKa: 3.6 y 9.1 (3). La solubilidad se ve notablemente incrementada al ionizarse su grupo carboxilo, favoreciéndose así la formación de interacciones electrostáticas que son compensadas por interacciones apolares al reducir el pH hasta 7.4. En la obtención de los estados de agregación a nivel de laboratorio, fue necesario el empleo de diferentes proporciones de AmB y excipientes, siendo necesario una relación en masa de 1:71 entre AmB : γ -CD para la formación de complejos de inclusión y un ratio 1 : 2 entre AmB:NaDC 1:2 para formar micelas.

La utilización de diferentes ratios entre AmB y excipientes junto con el ajuste de pH tienen un papel fundamental en las interacciones producidas entre ambos compuestos en los diferentes estados de agregación. El cambio de pH en la elaboración del dímero es fundamental, ya que para obtener el dímero y el poli-agregado se utilizan los mismos excipientes y en el mismo ratio, por lo que es necesaria la ionización del ácido carboxílico de la AmB para favorecer su interacción con el NaDC en lugar de consigo misma y evitar la aparición de agregados. Los estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) mostraron que con el tiempo se producía un aumento en la cantidad de

NaDC liberada al medio, así como un proceso de agregación acompañado de turbidez en el medio. Esto puede sugerir la unión de dos moléculas de NaDC a una molécula de AmB, por diferentes regiones de la molécula de AmB, formando dos tipos de interacción, una muy estable y otra más inestable, siendo aquellas moléculas que se unen mediante interacciones más lábiles las que son liberadas al medio con el paso del tiempo y desestabilizan el estado dimérico transformándose en poliagregado. Por otro lado, la interacción entre AmB y γ -CD podría ajustarse a lo propuesto por otros autores mediante simulaciones de dinámica molecular (4). En este caso, una molécula de AmB permanecería insertada en la cavidad creada por dos moléculas de γ -CD según un modelo T-T (“tail-tail” o “cola-cola”) a excepción del grupo micosamina presente en la estructura del antifúngico, el cual quedaría fuera de dicha cavidad. Además se han propuesto otros tipos de interacción entre la AmB y la CD como H-H, H-T o T-H (H significaría “head” o “cabeza”); sin embargo, se cree que el modelo T-T es el más probable de los cuatro, teniendo en cuenta la gran cantidad de grupos –OH presentes en la cabeza del anillo de γ -CD; estos grupos podrían interaccionar mucho más fácilmente con los grupos polares de la AmB, además de resultar más favorable energéticamente, ya que las dos cadenas presentes en la estructura de la AmB podrían ser difíciles de introducir en la cavidad interna de una única γ -CD.

Por otro lado, se observó que los estados de agregación, al estar liofilizados, presentaron un carácter principalmente amorfo (5, 6). Dentro de los tres estados, el poli-agregado fue el estado que presentó mayor cristalinidad (7, 8), mientras que el dímero y el monómero eran de naturaleza amorfa.

Los tres estados de agregación mostraron una tendencia diferente a desencadenar uno de los dos mecanismos de acción propuestos para la AmB. El monómero fue el estado de agregación más selectivo por el mecanismo en el que se desencadena estrés oxidativo, mientras que el dímero y el poli-agregado presentaron mayor afinidad por el ergosterol de las membranas plasmáticas y la formación de poros en la membrana. Esto puede deberse al tamaño de partícula, ya que un menor tamaño de partícula puede favorecer la entrada del fármaco al interior celular; de esta forma el monómero puede difundir más libremente a través de la membrana, alcanzando el citoplasma y desencadenando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en comparación con el dímero y el poliagregado.

Por otro lado, la diferencia entre la selectividad hacia un mecanismo de acción u otro entre el dímero y el poli-agregado, puede deberse a la concentración. Los estados de agregación no son puros, sino que se caracterizan por presentar un equilibrio entre las tres formas de agregación, estando más desplazado hacia un lado u otro en función de si hablamos de monómero, dímero o poli-agregado. A elevadas concentraciones, este equilibrio está desplazado hacia las formas agregadas, mientras que a bajas concentraciones, por debajo de la concentración crítica de agregación ($<1 \mu\text{g/ml}$) (9, 10), el equilibrio se desplaza hacia el monómero. Esto hace que a concentraciones por debajo de la concentración crítica de agregación, se produjese una mayor producción de ROS en el estado poli-agregado. Teniendo en cuenta todo lo anterior, se pudo

concluir que modificando el tamaño de partícula y el estado de agregación de la AmB, se pueden obtener formulaciones con las características fisicoquímicas deseadas para dirigir la formulación hacia un mecanismo de acción y uso terapéutico determinado.

Además, al conocer las interacciones que la AmB presenta con otros excipientes, así como la afinidad por uno u otro mecanismo de acción, los experimentos llevados a cabo permitieron establecer cómo se produce la unión del fármaco con las células fúngicas o parasitarias para producir eficacia o con las células humanas para producir toxicidad. De esta forma, se cree que la interacción clave se produce entre el $-NH_2$ de la AmB y el $-OH$ contiguo al C3 del ergosterol y colesterol en células fúngicas y humanas, respectivamente (11).

En definitiva, el estado poli-agregado de AmB podría ser el más beneficioso para desarrollar nuevas formulaciones, mientras que el monómero sería el que podría presentar mayor número de efectos indeseados, con un balance beneficio-riesgo mucho menor. Además, el incremento en la producción de ROS, es un mecanismo mucho menos específico que está relacionado con otros mecanismos de toxicidad, como daños en el DNA, que están directamente relacionados con carcinogénesis (12).

Después de llevar a cabo un estudio tan detallado de los estados de agregación de la AmB, se consideró de gran importancia el desarrollo de formulaciones tópicas conteniendo este fármaco, debido a la ausencia de una terapia eficaz y segura para tratar leishmaniasis cutáneas (CL) y micosis cutáneas las cuales presentan un alto número de resistencias. Estas infecciones pueden ser tratadas con formulaciones tópicas conteniendo antifúngicos de la familia de los azoles (ketoconazol, clotrimazol) (13), cremas de paromomicina con eficacia muy variable o la administración de antimoniales pentavalentes directamente en la propia lesión en el caso de CL (14). Además, estas patologías también pueden ser tratadas en la actualidad con la administración intravenosa de formulaciones comercializadas de AmB; sin embargo, esta vía de administración no se considera la más adecuada para infecciones locales debido a los efectos indeseados que puede presentar. Por otro lado, se ha demostrado que la encapsulación de fármacos con actividad antifúngica y anti-parasitaria en nano-transportadores favorece la vectorización de estos fármacos a los tejidos diana, minimizando los efectos adversos (15). Algunos de estos nano-transportadores tienen la capacidad de penetrar a través de membranas fisiológicas, como la piel, siendo una estrategia muy prometedora en el desarrollo de formulaciones tópicas (16-18). Por esta razón, el desarrollo de transferosomas de AmB (AmB-TFs) se consideró una buena solución para tratar infecciones cutáneas debido a la capacidad de deformarse que presentan estas vesículas (19, 20), permitiendo un incremento en la permeabilidad de la AmB a través del estrato córneo llegando hasta capas más profundas como la epidermis. Estas vesículas contienen en su composición fosfolípidos y surfactantes, siendo estos últimos derivados de sales biliares o tensioactivos no iónicos con capacidad de desestabilizar las vesículas, aumentando así su elasticidad al reducir la tensión superficial (20). Además, los surfactantes derivados de sales biliares se cree que pueden tener un efecto anti-fúngico y anti-parasitario *per se*, obteniéndose así un efecto sinérgico con la AmB y un aumento de la eficacia de la formulación (21, 22).

Por todo lo mencionado anteriormente, para el desarrollo de AmB-TFs, se seleccionaron como excipientes fosfatidilcolina y NaDC. La fosfatidilcolina es un fosfolípido catalogado como excipiente generalmente reconocido como seguro (GRAS). Por su parte, el NaDC es un surfactante con una estructura similar a las sales biliares.

En la **publicación 5**, aparece reflejado el desarrollo de estas formulaciones, que se obtuvieron por el método de hidratación en capa fina, mientras que su composición se optimizó mediante un diseño de experimentos (DoE) de tipo Box-Behnken. Así, se obtuvo de manera eficiente una formulación formada por un 0.5 % de fármaco, 14.09 % de surfactante y 85.41 % de fosfolípidos, reconstituidos con una mezcla de etanol en buffer fosfato (PBS) a pH 7.4 en un ratio 8.5:91.5 (V:V). Esta formulación es fácil de preparar en el laboratorio, teniendo en cuenta que al finalizar el proceso es necesario realizar un proceso de sonicación para disminuir el tamaño de partícula de los TFs. Esta formulación líquida se puede liofilizar mediante la adición de manitol como agente crioprotector, incrementándose considerablemente su estabilidad fisicoquímica. Este último proceso podría considerarse un inconveniente debido al elevado coste del proceso, ya que requiere una gran cantidad de energía para producir la sublimación del agua (23). Sin embargo, la mejora en la estabilidad de la formulación por encima de 6 meses es una ventaja tecnológica de gran utilidad en la práctica clínica.

Por otro lado, la elección de excipientes que sean bien tolerados por los pacientes es de gran importancia en el desarrollo de formulaciones por vía tópica, ya que, al ser aplicada en la piel, efectos adversos como picores o rojeces pueden producir rechazo, complicándose así la adherencia al tratamiento. Además de no mostrar ningún efecto adverso en la piel, la formulación resultó ser segura en los glóbulos rojos, presentando una HC_{50} 16 veces mayor que la AmB disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO). También la formulación fue segura frente a macrófagos, con un índice de selectividad (SI) superior a 2. Este punto también es importante teniendo en cuenta que la forma infectiva de los parásitos del género *Leishmania* spp. son los amastigotes y éstos son parásitos intracelulares que residen en los macrófagos (24). Por lo tanto, es esencial que la formulación que se desarrolle sea efectiva y segura al mismo tiempo.

Otro punto importante es la actividad antifúngica *in vitro* que presentó la formulación frente a tres especies distintas del género *Candida* spp. Los AmB-TFs fueron eficaces frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Esto último es de gran importancia debido a la elevada incidencia en la aparición de resistencias que presenta esta especie (25). Además, esta formulación presentó una buena permeabilidad a través de piel de ratón tal y como mostraron los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Al evaluar la permeabilidad *in vivo* de estas formulaciones se pudo verificar que la aplicación de microagujas en la superficie de la piel durante unos segundos antes de la administración favorece la formación de microporos que permiten una mejor difusión de la formulación a tiempos cortos (< 1 h).

Además de la ausencia de tratamientos de AmB de administración tópica, en la actualidad tampoco existe en el mercado ninguna formulación oral que contenga AmB en su composición. Esta vía de

administración resultaría útil en el tratamiento de micosis sistémicas y leishmaniasis visceral (VL), evitando los inconvenientes de la vía intravenosa, favoreciendo el cumplimiento terapéutico y evitando la hospitalización del paciente.

El desarrollo de una formulación oral de AmB eficaz y segura es uno de los retos que los expertos en formulación de antimicrobianos llevan persiguiendo desde hace décadas. Sin embargo, aún no se ha conseguido desarrollar una terapia útil para infecciones sistémicas debido a la mínima absorción oral que presenta la AmB ($< 0.9\%$) (26), alcanzándose concentraciones en plasma por debajo de la concentración mínima inhibitoria requerida para poder tener eficacia terapéutica.

Teniendo en cuenta la estructura química que posee la AmB, se puede comprender que la biodisponibilidad de este fármaco por vía oral es muy limitada. Esto, además, se pudo evaluar en el estudio de los estados de agregación de la AmB, ya que el fármaco sólo fue soluble al añadir excipientes como la γ -CD y el NaDC y al ajustar el pH de la mezcla hasta un pH extremadamente básico para favorecer las interacciones con estos excipientes y evitar que la AmB se agregue. Además, la AmB presenta un peso molecular muy elevado (924 g/mol), mientras que la biodisponibilidad oral se ve favorecida en compuestos normalmente con un peso molecular bajo (27). Todo esto complica la obtención de formulaciones de AmB para ser administradas por vía oral (26).

Para solventar el problema de la baja biodisponibilidad oral que presenta la AmB, es necesario el uso de excipientes que mejoren la solubilidad del fármaco en fluidos gastrointestinales, permitiendo la absorción del fármaco. Hasta ahora, se han desarrollado formulaciones poliméricas y lipídicas para mejorar la biodisponibilidad oral de la AmB (15, 28, 29). De todos ellos, la utilización de nano-partículas de N-palmitoil-N-monometil-N,N-dimetil-N,N,N-trimetil-6-O-glicol quitosán (GCPQ) obtuvo los resultados más prometedores, con un incremento en la biodisponibilidad del fármaco de hasta el 24.7 % y un aumento en la biodistribución de la AmB en los órganos diana (hígado, bazo y pulmón).

La dosis recomendada en formulaciones de AmB es de 5 mg/kg (30). Esta dosis suele administrarse dos veces al día, con el riesgo de la aparición de efectos adversos a nivel gastrointestinal, como vómitos o diarrea (31). Por ello, la elección de excipientes bien tolerados, como la inulina, que es un oligosacárido prebiótico que ha demostrado tener eficacia como protector de la mucosa gastrointestinal, es esencial para conseguir que la AmB por vía oral sea bien tolerada (32, 33). Por otro lado, es conveniente la utilización de otros excipientes que permitan la mucoadhesión y captación por parte de los enterocitos, favoreciendo la absorción de moléculas con baja permeabilidad, como la AmB (34, 35). Por este motivo, la utilización de quitosán de baja viscosidad, junto con agentes solubilizantes como el NaDC y el Soluplus® (co-polímero formado por polivinil caprolactama, polivinil acetato y polietilenglicol) podría resultar muy útil para incrementar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles y poco permeables. Además, la utilización de celulosa microcristalina (MCC) aporta dureza y consistencia a los gránulos creados

y al mismo tiempo actúa como disgregante, siendo especialmente útil en el desarrollo de formas farmacéuticas orales.

Una estrategia que está en auge en la actualidad es la llamada combinación en dosis fijas (FDC), que consiste en la combinación de al menos dos fármacos en la misma forma farmacéutica (36, 37). Esta estrategia se utiliza tanto en terapia antimicrobiana como en otro tipo de patologías. La combinación de AmB con otros fármacos con actividad antifúngica o antiparasitaria combinados dentro de la misma forma farmacéutica ha sido poco estudiada con anterioridad, pero podría resultar útil para potenciar la eficacia de ambos agentes antiinfecciosos, obteniéndose así un efecto sinérgico (38, 39). Por este motivo, se utilizó un DoE para optimizar la composición de un núcleo con AmB utilizando los excipientes mencionados anteriormente. De esta forma se obtuvieron pellets con AmB por granulación por vía húmeda que posteriormente fueron recubiertos por atomización en lecho fluido. En este recubrimiento se incluyeron otros fármacos, como itraconazol (ITR), miltefosina (MLT) y alopurinol (ALL) solubilizados mediante diferentes agentes poliméricos, como el Soluplus® o la hidroxipropilmetilcelulosa con residuos acetato y succinato (HPMCAS) en una mezcla de diclorometano (DCM) y etanol. Esta solución se atomizó formando pequeñas gotículas que se depositaron en la superficie del núcleo, dando lugar a la formación de dispersiones amorfas sólidas con el fin de potenciar la solubilidad de los fármacos de la cubierta.

De esta forma, se obtuvieron en total 12 FDCs con una estructura rugosa y cristalina en el núcleo y una superficie mucho más lisa y amorfa. El desarrollo, estudio farmacotécnico y estudio *in vitro* e *in vivo* de estas formulaciones aparece reflejado en la **publicación 6**. Además de su morfología, el recubrimiento por atomización en lecho fluido modificó las propiedades fisicoquímicas de los pellets (5). Los difractogramas mostraron una estructura cristalina de los pellets sin recubrir; por el contrario, en las formulaciones recubiertas, se pudo apreciar un halo amorfo. Esto pudo deberse a una transformación en el estado amorfo consecuencia de la interacción mediante puentes de hidrógeno del fármaco de la cubierta con el polímero utilizado, pero también puede deberse a un efecto de dilución causado por la adición de excipientes con estructura amorfa. Además, se encontraron diferencias entre las formulaciones en términos de superficie específica y captación de agua, siendo el núcleo sin recubrir la formulación con una mayor superficie específica y mayor higroscopicidad.

Los ensayos de velocidad mostraron que la formulación sin recubrir tuvo un perfil de liberación retardado caracterizado por no disolverse a pH ácido, protegiendo así al fármaco de su degradación en el estómago, pero con una liberación rápida en el pH intestinal, mientras que las formulaciones recubiertas hicieron que la liberación de la AmB fuese sostenida durante 24 h. En el caso del itraconazol (ITR) y la formación de dispersiones amorfas sólidas, tuvo lugar el denominado efecto “spring” (40, 41), en el cual se consigue un estado de supersaturación durante varias horas, favoreciéndose así la absorción oral del fármaco. Por otro lado, la velocidad de disolución de la miltefosina (MLT) no pudo ser evaluada *in vitro* al no presentar ningún grupo funcional detectable por UV, y el ALL tuvo una liberación extremadamente lenta (< 15% a las 24 h) en medio acuoso

debido a su naturaleza hidrofóbica. Las formulaciones fueron estables a largo plazo, bien refrigeradas o a temperatura ambiente en condiciones de desecación.

Las formulaciones obtenidas fueron útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas causadas por *C. albicans* y *C. parapsilosis*, que son dos de las especies más frecuentes causantes de micosis sistémicas (42). En el caso de *C. krusei*, que es una especie oportunista con alta prevalencia de resistencias, el comportamiento fue concentración-dependiente, indicando que se requieren de dosis más altas para ejercer una acción antifúngica adecuada (43). Estas formulaciones además mostraron una buena actividad antiparasitaria, presentando una IC₅₀ para *L. infantum* y *L. donovani* a concentraciones por debajo de 5 µM. Por otro lado, la HC₅₀ fue al menos 5 veces mayor que la IC₅₀, indicando que el balance eficacia/toxicidad de esas nuevas formulaciones era elevado. Todas las formulaciones presentaron una buena selectividad frente a agentes patógenos en comparación con macrófagos (SI > 1), necesitando concentraciones al menos 2.3 veces superiores para producir citotoxicidad, excepto en el caso de formulaciones que contenían ALL en su composición ya que fueron las más hemolíticas.

En los estudios farmacocinéticos, la AmB y el ITR mostraron un comportamiento muy diferente, ya que la concentración de AmB disminuyó muy rápidamente en sangre distribuyéndose a tejidos mientras que el ITR se mantuvo circulando en plasma durante tiempos mucho más prolongados. La AmB se une a proteínas plasmáticas (>90 %) (3), especialmente a la albúmina sérica (44), mientras que la unión a proteínas plasmáticas del ITR es mayor, en torno al 99.8 % (45). Teniendo en cuenta la elevada unión a proteínas que ambos fármacos presentan y que sólo la fracción de fármaco libre es capaz de pasar de sangre a tejidos (46), la AmB podría haber sido endocitada por células del sistema inmunitario y transportada a diferentes tejidos. Dicho fármaco se distribuyó mayoritariamente en pulmón, seguido de hígado, bazo y por último riñón. El pulmón fue el tejido con la mayor cantidad de AmB acumulada, por lo que estas formulaciones podrían ser útiles para tratar infecciones pulmonares invasivas causadas por *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. o *Pneumocystis* spp. (47). El riñón resultó ser el tejido diana en el que menor cantidad de AmB se acumuló, lo cual puede ser beneficioso, ya que la AmB normalmente se une a las células del riñón debido a que son ricas en colesterol, produciendo nefrotoxicidad y no fue el caso de estas FDCs (48). La alta cantidad de AmB acumulada en hígado y bazo son la explicación de los niveles tan favorables de reducción en la tasa de parasitismo observados en hámsters infectados con leishmaniasis visceral. Esto demuestra que estas formulaciones también podrían ser efectivas frente al tratamiento de esta enfermedad en la práctica clínica en humanos.

Estas formulaciones, además, presentaron una buena tolerabilidad gastrointestinal, ya que los animales no sufrieron una pérdida de peso durante los estudios ni de farmacocinética ni de farmacodinamia (31). Aun así, no se descarta la aparición de síntomas de este tipo en caso de tratamientos más largos, por lo que no se recomiendan tratamientos de más de 10 días consecutivos. La toxicidad renal se vio limitada. Este hecho se pone en evidencia debido a la menor acumulación de fármaco en este tejido y también a una eliminación dual no sólo por orina sino

también por bilis mediante la circulación enterohepática como lo confirma la concentración de AmB detectada en ambos órganos excretores.

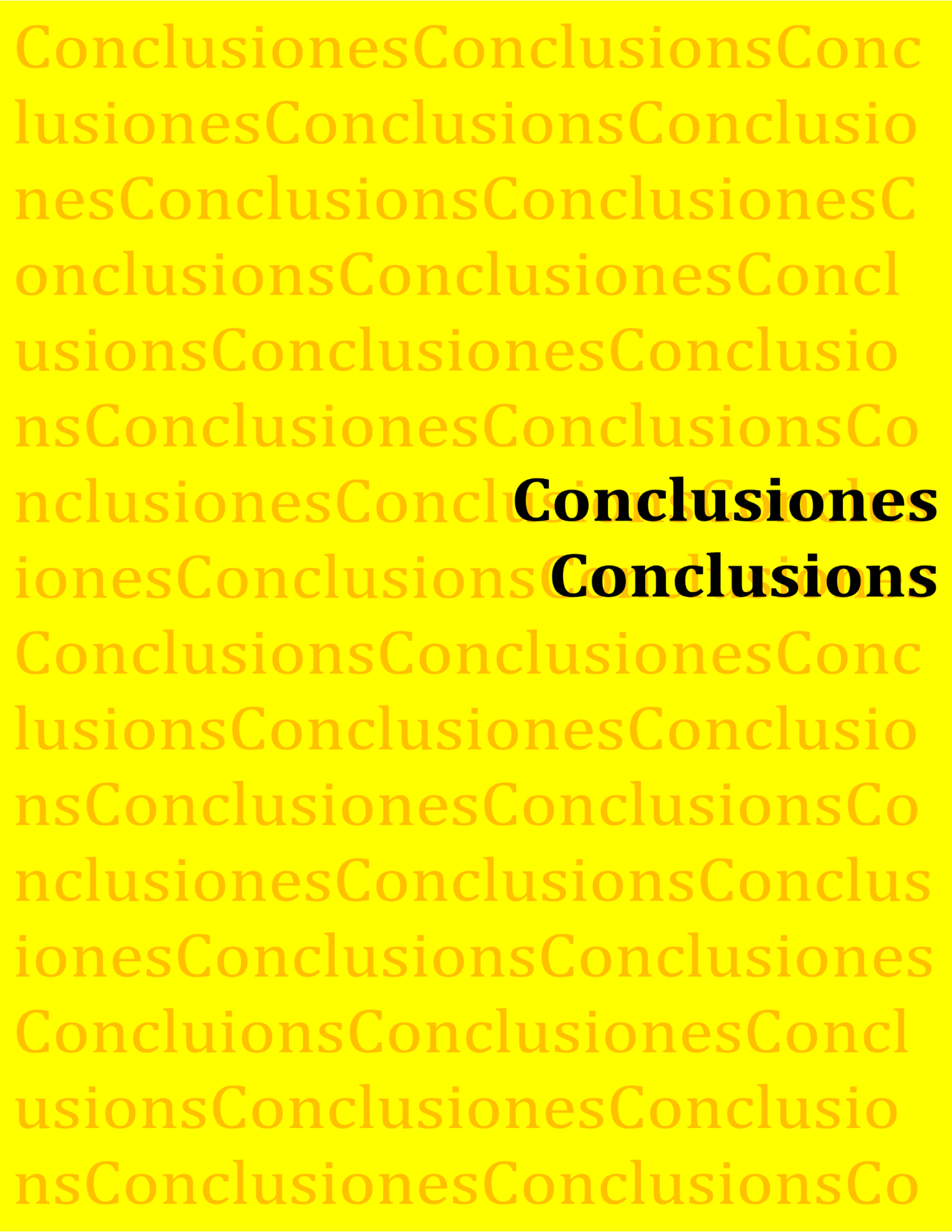
REFERENCIAS

1. Ruiz HK, Serrano DR, Dea-Ayuela MA, Bilbao-Ramos PE, Bolás-Fernández F, Torrado JJ, et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and Leishmania spp. *Int J Pharmaceut.* 2014;473(1):148-57.
2. Driscoll DF. Stability and compatibility assessment techniques for total parenteral nutrition admixtures: setting the bar according to pharmacopeial standards. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care.* 2005;8(3):297-303.
3. DrugBank. Amphotericin B, data sheet. Available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00681> (accessed on: 8th November 2019)
4. He J, Chipot C, Shao XG, Cai WS. Cooperative Recruitment of Amphotericin B Mediated by a Cyclodextrin Dimer. *J Phys Chem C.* 2014;118(41):24173-80.
5. Morrow EA, Terban MW, Thomas LC, Gray DL, Bowman MJ, Billinge SJL, et al. Effect of amorphization method on the physicochemical properties of amorphous sucrose. *J Food Eng.* 2019;243:125-41.
6. Willart JF, Descamps M. Solid State Amorphization of Pharmaceuticals. *Mol Pharmaceut.* 2008;5(6):905-20.
7. PubChem. Monosodium phosphate, data sheet. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Monosodium-phosphate> (accessed on: 11th July 2019)
8. PubChem. Disodium hydrogen phosphate, data sheet. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Disodium-hydrogen-phosphate> (accessed on: 11th July 2019)
9. Lavasanifar A, Samuel J, Sattari S, Kwon GS. Block copolymer micelles for the encapsulation and delivery of amphotericin B. *Pharm Res.* 2002;19(4):418-22.
10. Aramwit P, Yu BG, Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS. The Effect of Serum Albumin on the Aggregation State and Toxicity of Amphotericin B. *J Pharm Sci-U.S.* 2000;89(12):1589-93.
11. Saka Y, Mita T. Interaction of amphotericin B with cholesterol in monolayers, aqueous solutions, and phospholipid bilayers. *J Biochem.* 1998;123(5):798-805.
12. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, et al. Mitogenic Signaling Mediated by Oxidants in Ras-Transformed Fibroblasts. *Science.* 1997;275(5306):1649.
13. Dias MF, Bernardes-Filho F, Quaresma-Santos MV, Amorim AG, Schechtman RC, Azulay DR. Treatment of superficial mycoses: review. Part II. *An Bras Dermatol.* 2013;88(6):937-44.
14. Espuelas S. Conventional formulations and emerging delivery systems for the topical treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Ther Deliv.* 2015;6(2):101-3.
15. Serrano DR, Lalatsa A, Dea-Ayuela MA, Bilbao-Ramos PE, Garrett NL, Moger J, et al. Oral particle uptake and organ targeting drives the activity of amphotericin B nanoparticles. *Mol Pharm.* 2015;12(2):420-31.

16. Rolon M, Serrano DR, Lalatsa A, de Pablo E, Torrado JJ, Ballesteros MP, et al. Engineering Oral and Parenteral Amorphous Amphotericin B Formulations against Experimental *Trypanosoma cruzi* Infections. *Mol Pharm*. 2017;14(4):1095-106.
17. Ruiz HK, Serrano DR, Dea-Ayuela MA, Bilbao-Ramos PE, Bolas-Fernandez F, Torrado JJ, et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania* spp. *Int J Pharm*. 2014;473(1-2):148-57.
18. Lalatsa A, Emeriewen K, Protopsalti V, Skelton G, Saleh GM. Developing transcutaneous nanoenabled anaesthetics for eyelid surgery. *The British journal of ophthalmology*. 2016;100(6):871-6.
19. Cevc G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1514(2):191-205.
20. Fernández-García R, Lalatsa A, Statts L, Bolás-Fernández F, Ballesteros MP, Serrano DR. Transfersomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *Int J Pharmaceut*. 2020;573:118817.
21. Serrano DR, Lalatsa A, Dea-Ayuela MA. Engineering Synergistically Active and Bioavailable Cost-effective Medicines for Neglected Tropical Diseases; The Role of Excipients. *Curr Top Med Chem*. 2017.
22. Yamamoto ES, Campos BL, Jesus JA, Laurenti MD, Ribeiro SP, Kallas EG, et al. The Effect of Ursolic Acid on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Is Related to Programed Cell Death and Presents Therapeutic Potential in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144946.
23. Ratti C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *J Food Eng*. 2001;49(4):311-9.
24. Kima PE. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol*. 2007;37(10):1087-96.
25. Vermitsky JP, Edlind TD. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(10):3773-81.
26. Torrado JJ, Serrano DR, Uchegbu IF. The oral delivery of amphotericin B. *Therapeutic Delivery*. 2012;4(1):9-12.
27. Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002;45(12):2615-23.
28. Gershkovich P, Sivak O, Wasan EK, Magil AB, Owen D, Clement JG, et al. Biodistribution and tissue toxicity of amphotericin B in mice following multiple dose administration of a novel oral lipid-based formulation (iCo-009). *J Antimicrob Chemoth*. 2010;65(12):2610-3.

29. Sivak O, Gershkovich P, Lin M, Wasan EK, Zhao J, Owen D, et al. Tropically stable novel oral lipid formulation of amphotericin B (iCo-010): biodistribution and toxicity in a mouse model. *Lipids in Health and Disease*. 2011;10(1):135.
30. AEMPS. AmBisome, data sheet. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/61117/FT_61117.html (accessed on: 29th December 2019)
31. Park N-H, Shin K-H, Kang MK. 34 - Antifungal and Antiviral Agents. In: Dowd FJ, Johnson BS, Mariotti AJ, editors. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry (Seventh Edition)*: Mosby; 2017. p. 488-503.
32. Guarner F. Studies with Inulin-Type Fructans on Intestinal Infections, Permeability, and Inflammation. *The Journal of Nutrition*. 2007;137(11):2568S-71S.
33. Buddington KK, Donahoo JB, Buddington RK. Dietary Oligofructose and Inulin Protect Mice from Enteric and Systemic Pathogens and Tumor Inducers. *The Journal of Nutrition*. 2002;132(3):472-7.
34. Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy VV. Why is Chitosan Mucoadhesive? *Biomacromolecules*. 2008;9(7):1837-42.
35. Siew A, Le H, Thiovolet M, Gellert P, Schatzlein A, Uchegbu I. Enhanced Oral Absorption of Hydrophobic and Hydrophilic Drugs Using Quaternary Ammonium Palmitoyl Glycol Chitosan Nanoparticles. *Mol Pharmaceut*. 2012;9(1):14-28.
36. Collier R. Reducing the "pill burden". *Can Med Assoc J*. 2012;184(2):E117-E8.
37. Gautam CS, Saha L. Fixed dose drug combinations (FDCs): rational or irrational: a view point. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;65(5):795-6.
38. Moriarty F, Bennett K, Fahey T. Fixed-dose combination antihypertensives and risk of medication errors. *Heart*. 2019;105(3):204-9.
39. Schlosser R. Fixed-Dose and Fixed-Ratio Combination Therapies in Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes*. 2019;43(6):440-4.
40. Bavishi DD, Borkhataria CH. Spring and parachute: How cocrystals enhance solubility. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. 2016;62(3):1-8.
41. Guzmán HR, Tawa M, Zhang Z, Ratanabanangkoon P, Shaw P, Gardner CR, et al. Combined Use of Crystalline Salt Forms and Precipitation Inhibitors to Improve Oral Absorption of Celecoxib from Solid Oral Formulations. *J Pharm Sci-U.S.* 2007;96(10):2686-702.
42. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):606-25.
43. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(2):515-21.

44. Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ. Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin B after administration of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(3):834-40.
45. DrugBank. Itraconazole, data sheet. Available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01167> (accessed on: 20th January 2020)
46. Arredondo G, Suárez E, Calvo R, Vazquez JA, García-Sánchez J, Martínez-Jordá R. Serum protein binding of itraconazole and fluconazole in patients with diabetes mellitus. *J Antimicrob Chemoth*. 1999;43(2):305-7.
47. Li Z, Lu G, Meng G. Pathogenic Fungal Infection in the Lung. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(1524).
48. Fernandez-Garcia R, de Pablo E, Ballesteros MP, Serrano DR. Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting. *Int J Pharm*. 2017;525(1):139-48.



Conclusions

Conclusions

Conclusiones

1. La AmB poliagregada y su utilización en el desarrollo de nuevas formulaciones podría ser un gran avance terapéutico, ya que es el estado de agregación con mejor balance beneficio/riesgo, mientras que el monómero muestra un balance más desfavorable que puede ser atribuido a su selectividad por el mecanismo inductor del estrés oxidativo. Hasta el momento las formulaciones comercializadas contienen AmB en estado dimérico, por lo que la utilización del estado poliagregado podría ser un recurso tecnológico prometedor en futuras formulaciones.
2. El tamaño de partícula demostró ser un factor clave en la vectorización de formulaciones de AmB, contribuyendo de forma significativa bien en la formación de poros en la membrana o en la inducción de estrés oxidativo. La modificación de dicho parámetro es una estrategia muy útil para producir una respuesta más selectiva en células fúngicas y parasitarias, reduciendo su toxicidad.
3. La encapsulación de AmB en transferosomas incrementó significativamente la permeabilidad del fármaco a través de la piel, demostrando además una buena selectividad con alta eficacia frente a *Candida spp* y *Leishmania* y una baja toxicidad frente a glóbulos rojos, macrófagos y células epiteliales.
4. La AmB encapsulada en transferosomas es un sistema de liberación muy útil en el tratamiento de leishmaniasis cutánea, ya que es capaz de transportar al fármaco hasta capas profundas de la piel donde se acantonan los parásitos. La penetración del fármaco, además, puede verse mejorada al aplicar microagujas durante unos segundos sobre la superficie de la piel.
5. El desarrollo de formulaciones combinadas de AmB con otros fármacos con actividad antifúngica y antiparasitaria, tales como el itraconazol, la miltefosina y el alopurinol, en forma de pellets recubiertos puede ser una buena opción de tratamiento por vía oral y una alternativa terapéutica a la vía intravenosa, ya que además de demostrar una alta eficacia frente a *Candida spp.* y *Leishmania spp*, presentan una buena biodisponibilidad oral con alta acumulación en tejidos diana (pulmón, hígado y bazo) y una menor llegada a riñón disminuyendo así el riesgo de nefrotoxicidad.
6. El uso de nanomedicinas y el desarrollo de formulaciones combinadas a dosis fijas con actividad sinérgica son dos recursos útiles que han demostrado mejorar la biodisponibilidad tópica y oral de fármacos complejos como la AmB, confiriéndole un balance beneficio/riesgo elevado.

Conclusions

1. Poly-aggregated AmB has shown a great potential in the engineering of novel formulations, considering that poly-aggregate was the aggregation state with the most favorable benefit/risk balance in comparison to the monomer, which has shown a poorer *in vitro* selectivity triggering mainly the oxidative stress.
2. Particle size played a key role in AmB targeting towards the mechanism of action, thus, tuning particle size is a promising strategy to trigger a selective action in fungal and parasitic cells, which leads to a decrease in toxicity.
3. Encapsulating AmB within transferosomes allowed an enhanced drug permeability across the skin into deeper layers showing a high efficacy against several *Candida* spp. and *Leishmania* spp., and a low toxicity against red blood cells, macrophages and epithelial cells.
4. AmB encapsulated in transferosomes is a useful drug delivery system for the treatment of cutaneous leishmaniasis, because AmB reaches deeper regions of the skin where parasites are accumulated. Drug permeation can be improved even further, when microneedles are applied prior to the topical administration of transferosomes on the surface of the skin.
5. Engineering of fixed-dose combination products of AmB with other antifungal and antiparasitic drugs such as itraconazole, miltefosine and allopurinol, as coated pellets is an optimal strategy for oral AmB delivery, but also a good alternative to the intravenous route. Coated pellets have shown a high efficacy against *Candida* spp. and *Leishmania* spp with an acceptable oral bioavailability and accumulation in target tissues (lung, liver and spleen) and kidney sparing reducing the risk of nephrotoxicity.
6. The development of nanomedicines and fixed-dose combination products are promising strategies for the topical and oral delivery of AmB with an enhanced benefit/toxicity balance.